



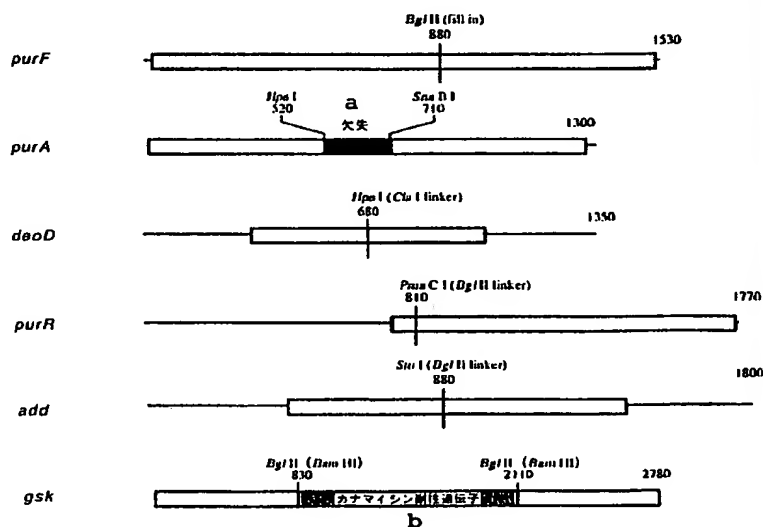
| | | |
|---|-----------|--|
| (51) 国際特許分類6 C12N 15/09, 1/21, C12P 19/32 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 19/32, C12R 1:19) | A1 | (11) 国際公開番号 WO99/03988 (43) 国際公開日 1999年1月28日 (28.01.99) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP98/03239 (22) 国際出願日 1998年7月17日 (17.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/194603 1997年7月18日 (18.07.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 松井 裕(MATSUI, Hiroshi)[JP/JP] 川崎 寿(KAWASAKI, Hisashi)[JP/JP] 島岡 恵(SHIMAOKA, Megumi)[JP/JP] 竹中康浩(TAKENAKA, Yasuhiro)[JP/JP] 倉橋 修(KURAHASHI, Osamu)[JP/JP] 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP) | | (74) 代理人 弁理士、遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 BR, CN, ID, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 |

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PURINE NUCLEOSIDES VIA FERMENTATION

(54) 発明の名称 発酵法によるプリンヌクレオシドの製造法

(57) Abstract

A process for producing purine nucleosides which comprises breeding and culturing microorganisms having a gene encoding an enzyme wherein the feedback inhibition has been substantially relieved by substituting one or two amino acid residues in PRPP amidotransferase encoded by *Escherichia coli* *purF*, a gene encoding a protein wherein the repressor in the purine nucleotide biosynthesis system encoded by *purR* has been inactivated and a gene encoding an enzyme wherein purine nucleoside phosphorylase encoded by *deoD* has been inactivated, a gene encoding an enzyme wherein succinyl-AMP synthase encoded by *purA* has been inactivated, a gene encoding an enzyme wherein 6-phosphogluconate dehydratase encoded by *edd* has been inactivated and a gene encoding an enzyme wherein phosphoglucose isomerase encoded by *pgi* has been inactivated, or the like.



a ... Deletion

b ... Kanamycin-resistant gene

エシエリヒア・コリのpurFにコードされるP R P Pアミドトランスフェラーゼの1ないし2アミノ酸置換により実質的にフィードバック阻害が解除された酵素をコードする遺伝子、purRにコードされるプリンヌクレチド生合成系のリプレッサーが不活化されたタンパク質をコードする遺伝子、ならびにdeoDにコードされるプリンヌクレオシド・フォスホリラーゼが不活化された酵素をコードする遺伝子、purAにコードされるサクシニル-AMPシンターゼが不活化された酵素をコードする遺伝子、eddにコードされる6-フォスフォグルコン酸デヒドラーゼが不活化された酵素をコードする遺伝子、ならびにpgiにコードされるフォスフォグルコース・イソメラーゼが不活化された酵素をコードする遺伝子等を有する微生物を育種し、当該微生物を培養することによりプリンヌクレオシドを製造する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-----------|----|----------------|----|------------|
| AL | アルバニア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SI | スロヴェニア |
| AM | アルメニア | FR | フランス | LR | リベリア | SK | スロヴァキア |
| AT | オーストリア | GB | ガボン | LS | レソト | SL | シエラ・レオネ |
| AU | オーストラリア | GB | 英国 | LT | リトアニア | SN | セネガル |
| AZ | アゼルバイジャン | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SZ | スワジランド |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | TD | チャード |
| BB | バルバドス | GH | ガーナ | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BE | ベルギー | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BF | ブルキナ・ファソ | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BG | ブルガリア | GW | ギニア・ビサウ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR | トルコ |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | | 共和国 | TT | トリニダード・トバゴ |
| BR | ブラジル | HR | クロアチア | ML | マリ | UA | ウクライナ |
| BY | ベラルーシ | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | UG | ウガンダ |
| CA | カナダ | ID | インドネシア | MR | モリタニア | US | 米国 |
| CF | 中央アフリカ | IE | アイルランド | MW | マラウイ | UZ | ウズベキスタン |
| CG | コンゴ | IL | イスラエル | MX | メキシコ | VN | ヴェトナム |
| CH | スイス | IN | インド | NE | ニジェール | YU | ユーゴスラビア |
| CI | コートジボアール | IS | アイスランド | NL | オランダ | ZW | ジンバブエ |
| CM | カメルーン | IT | イタリア | NO | ノルウェー | | |
| CN | 中国 | JP | 日本 | NZ | ニュージーランド | | |
| CU | キューバ | KE | ケニア | PL | ポーランド | | |
| CY | キプロス | KG | キルギスタン | PT | ポルトガル | | |
| CZ | チェコ | KP | 北朝鮮 | RO | ルーマニア | | |
| DE | ドイツ | KR | 韓国 | RU | ロシア | | |
| DK | デンマーク | KZ | カザフスタン | SD | スーダン | | |
| EE | エストニア | LC | セントルシア | SE | スウェーデン | | |
| ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SG | シンガポール | | |

- 1 -

明細書

発酵法によるプリンヌクレオシドの製造法

技術分野

本発明は 5' - イノシン酸および 5' - グアニル酸の合成原料として重要な物質であるイノシンおよびグアノシン等のプリンヌクレオシドの製造法、ならびにその製造に用いられる新規微生物に関する。

背景技術

発酵法によるイノシンおよびグアノシンの生産に関しては、アデニン要求株である、またはそれにプリンアナログをはじめとする各種の薬剤に対する耐性を付与したバチルス属の微生物（特公昭 38-23039、特公昭 54-17033、特公昭 55-2956、特公昭 55-45199、特開昭 56-162998、特公昭 57-14160、特公昭 57-41915、特開昭 59-42895）、およびブレバクテリウム属の微生物（特公昭 51-5075、特公昭 58-17592、Agric.Biol.Chem., 42, 399(1978)）等を用いる方法が知られている。

このような変異株を取得するには、従来、紫外線照射やニトロソグアニジン（N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine）処理などの変異誘起処理を行い、適当な選択培地を用いて、目的とする変異株を取得するという方法が行われてきた。一方で、遺伝子工学技術を用いた生産株の育種もバチルス属の微生物（特開昭 58-158197、特開昭 58-175493、特開昭 59-28470、特開昭 60-156388、特開平 1-27477、特開平 1-174385、特開平 3-58787、特開平 3-164185、特開平 5-84067、特開平 5-192164）、およびブレバクテリウム属の微生物（特開昭 63-248394）で行われている。

発明の開示

本発明は、発酵法によってプリンヌクレオシドを製造するために好適な微生物を創製することを課題とする。

- 2 -

本発明者らは上記課題を解決するために、発酵法によりプリンヌクレオシドを製造するために従来用いられてきた微生物とは属を異にするエシェリヒア属細菌にプリンヌクレオシド生産能を付与することを着想し、これを実現することに成功し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生産能を有する微生物を提供する。

詳しくは、当該微生物として、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の細胞内での活性が上昇することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した当該微生物を提供する。より詳しくは、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の遺伝子の発現量が上昇することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した当該微生物、および、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節が解除されることによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した当該微生物を提供する。

プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節は、たとえばフィードバック阻害が解除されることによって解除される。

上記プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素とは、たとえばホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) アミドトランスフェラーゼおよびホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) シンセターゼである。

上記プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節を解除する手段としては、たとえばプリン・リプレッサーの欠失がある。

さらに本発明は、プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応が遮断されることによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した当該微生物を提供する。

上記プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応は、たとえばサクシニル-アデノシンモノリン酸 (AMP) シンターゼ、プリンヌクレオシド・フォスフォリラーゼ、アデノシン・デアミナーゼ、イノシン-グアノシン・キナーゼ、グアノシンモノリン酸 (GMP) リダクターゼ、6-フォスフォグルコン酸デヒドラーゼ、フォスフォグルコース・イソメラーゼ、アデニン・デアミナーゼ、キサントシン・フォスフォリラーゼから選ばれる酵素に触媒される反応がある。

さらに、本発明は、プリンヌクレオシドの細胞内へ取り込みを弱化することによってプリンヌクレオシド生産能を強化した当該微生物を提供する。

プリンヌクレオシドの細胞内へ取り込みは、プリンヌクレオシドの細胞内への取り込みに関与する反応を遮断することによって弱化することができる。上記プリンヌクレオシドの細胞内への取り込みに関与する反応は、たとえばヌクレオシドパーミアーゼに触媒される反応である。

また本発明は、上記微生物を培地に培養し、プリンヌクレオシドを生成蓄積せしめ、プリンヌクレオシドを回収することを特徴とする発酵法によるプリンヌクレオシドの製造法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生産能を有する微生物

本発明にいうエシェリヒア属に属する微生物の例としては、エシェリヒア・コリ(*E.coli*)等があげられる。*E.coli*を遺伝子工学的手法を用いて育種する場合には、*E.coli* K12株及びその誘導体を用いることができる。

本発明にいうプリンヌクレオシドとは、たとえばイノシン、グアノシン、アデノシン等を含む。

本発明にいうプリンヌクレオシド生産能とは、プリンヌクレオシドを培地中に生産蓄積する能力を意味する。また、プリンヌクレオシド生産能を有するとは、そのエシェリヒア属に属する微生物が、*E.coli*の野生株例えばW3110株よりも多量にプリンヌクレオシドを培地中に生産蓄積することを意味し、好ましくは、後記実施例1に記載した条件で培養して50 mg/L以上、さらに好ましくは100 mg/L以上、さらになお好ましくは200mg/L以上、もっとも好ましくは500 mg/L以上のイノシンを培地中に生産蓄積することを意味する。

エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生産能を有する微生物を育種するには、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の細胞内での活性を上昇させることによる育種、一例として、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の遺伝子の発現量を上昇させることによる育種を採用できる。あるいは、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節を解除することによる育種も採用できる。

さらに、プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応が

遮断されることによる育種、および、プリンヌクレオシドの細胞内への取り込みを弱化することによる育種も採用できる。

(2) プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の細胞内での活性が上昇した微生物

エシェリヒア属に属する微生物におけるプリンヌクレオシド生合成に関与する全酵素と、同酵素が触媒する全反応はすでに明らかにされている (*Escherichia coli* and *Salmonella* CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY second Edition vol. 1 and vol. 2 ASM PRESS WASHINGTON D.C.)。これら酵素のうち、律速段階となっている反応を触媒する酵素の酵素活性を上昇させることによって、プリンヌクレオシド生産能を付与することができる。そのような律速段階となっている反応を触媒する酵素は、たとえばPRPPアミドトランスフェラーゼ(PRPP amidotransferase)やPRPPシンセターゼ(PRPP synthetase)である。

プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の細胞内での活性を上昇させる手段を、以下例を挙げて説明するが、これらに限定されるものではない。

プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の細胞内での活性を上昇させる手段としては、酵素の遺伝子の発現量を上昇させることが挙げられる。

遺伝子の発現量を上昇させる手段としては、遺伝子の調節領域の改良、遺伝子のコピー数の上昇などが挙げられるが、これらに限定されるものでない。

調節領域の改良とは、遺伝子の転写量を増加させる改変を加えることをいう。たとえばプロモーターに変異を導入することによってプロモーター強化をおこない下流にある遺伝子の転写量を増加させることができる。プロモーターに変異を導入する以外にも、lac, trp, tac, trc, PLその他の微生物内で機能するプロモーターを新たに導入してもよい。あるいは、エンハンサーを新たに導入することによって遺伝子の転写量を増加させることができる。染色体DNAへのプロモーター等の遺伝子の導入については、例えば特開平1-215280号公報に記載されている。

遺伝子のコピー数の上昇は、具体的には、遺伝子を多コピー型のベクターに接続して組換えDNAを作製し、同組換えDNAを微生物に保持させることによって得られる。ここでベクターとは、プラスミドやファージ等広く用いられている

ものを含むが、これら以外にも、トランスポゾン(Berg, D.E. and Berg, C.M., Bio/Technol., 1, 417(1983))やMuファージ (特開平2-109985)も含む。遺伝子を相同組換え用プラスミド等を用いた方法で染色体に組込んでコピー数を上昇させることも可能である。

エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の遺伝子の発現量の上昇した微生物の誘導に当たっては、主としてE.coliの既知の遺伝子情報に基づき、PCR(polymerase chain reaction)法を用いて必要な遺伝子領域を増幅取得し育種に用いることができる。

たとえばE.coli K12のW3110株 (ATCC27325)の染色体DNAよりPCR法を用いてPRPPアミドトランスフェラーゼをコードする遺伝子であるpurFをクローニングする。この際使用する染色体DNAはE.coli由来であればどの菌株でもよい。purFはアデノシンモノリン酸(AMP)やグアノシンモノリン酸(GMP)でフィードバック阻害を受けるPRPPアミドトランスフェラーゼをコードする遺伝子を言い、遺伝的多形性などによる変異型も含む。なお、遺伝的多形性とは、遺伝子上の自然突然変異によりタンパク質のアミノ酸配列が一部変化している現象をいう。

プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の細胞内での活性を上昇させる手段としては、酵素の構造遺伝子自体に変異を導入して、酵素そのものの活性を上昇させることも挙げられる。

プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の細胞内での活性を上昇させる手段としては、プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節を解除することも挙げられる。

プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節とは、同酵素の活性を負に制御する仕組みをいい、たとえば生合成経路中間体または最終産物によるフィードバック阻害、アテニュエーション、転写抑制などをさす。微生物が製造したプリンヌクレオシドは、同調節を通じてプリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の活性を阻害し、または、同酵素をコードする遺伝子の発現を抑制する。したがって、微生物にプリンヌクレオシドを生産させるためには同調節を解除することが望ましい。

上記調節を受けるプリンヌクレオシド生合成に関与する酵素は、AMPやGMPでフ

フィードバック阻害を受けるPRPPアミドトランスフェラーゼやアデノシンジリン酸(ADP)によるフィードバック阻害を受けるPRPPシンセターゼがあげられる。そのほか、GMPによるフィードバック阻害をイノシンモノリン酸デヒドロゲナーゼ (IMP dehydrogenase: *guaB*) とGMPシンセターゼ(GMP synthetase: *guaA*)とが受けている。また、プリン・オペロン、*guaBA*は抑制を受けている。

調節を解除する方法としては、酵素をコードする遺伝子またはその調節領域に変異を導入する方法がある。同変異としては、フィードバック阻害を解除する変異があり、これは、通常には、構造遺伝子内の変異である。また、同変異としては、アテニュエーションを解除する変異があり、これは、通常には、アテニュエーター内の変異である。さらに、同変異としては、抑制を解除する変異があり、これは、通常には、リプレッサーと呼ばれる調節タンパク質をコードする遺伝子の変異、またはオペレーター領域内の変異である。

抑制を解除する変異としては、プリン・リプレッサーを不活化させる変異がある。同リプレッサーは、プリンヌクレオチドが多量に存在する条件下でプリンオペロンのオペレーター領域に結合し、結果として同オペロンの転写が抑制される。同リプレッサーの不活化は、抑制の解除につながる。

遺伝子に変異を生じさせるには、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H.J., *Methods in Enzymology*, 154, 350(1987))、リコンビナントPCR法 (PCR Technology, Stockton Press(1989))、特定の部分のDNAを化学合成する方法、または当該遺伝子をヒドロキシアミン処理する方法や当該遺伝子を保有する菌株を紫外線照射処理、もしくはニトロソグアニジンや亜硝酸などの化学薬剤で処理する方法がある。また遺伝子の機能を完全に不活化する目的の場合には適当な制限酵素サイトにDNAの付加や欠失を入れる方法がある。

プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節が解除されたものを選択する場合、酵素の発現量を酵素活性を測定することによって調べるか、抗体を用いて調べることができる。また、酵素の調節が解除された変異株を取得する一つの方法として、8-アザアデニンや8-アザグアニンなどのプリンアナログを含む最小培地で生育する菌株を選択し、酵素の発現量や活性の変化を確認する方法がある。

(3) プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応を遮断することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した微生物

エシェリヒア属に属する微生物のプリンヌクレオシド生合成経路は明らかになっており、プリンヌクレオシド生合成に関与する全酵素と、同酵素が触媒する全反応はすでに明らかにされている(*Escherichia coli* and *Salmonella* CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY second Edition vol. 1 and vol. 2 ASM PRESS WASHINGTON D.C.). これらに加え、他の代謝産物にいたる反応のいくつかは明らかになっている。

他の代謝産物にいたる反応が遮断された微生物は、同代謝産物を要求するようになる可能性がある。同代謝産物を要求するようになった微生物を培養するためには、培地に栄養物質として同代謝産物あるいはその中間体(前駆体)を添加する必要がある。したがって、遮断されるべき反応を決定する際には、培地に新たな同代謝産物を添加する必要が生じない反応を選択することが望ましい。

また、他の代謝産物にいたる反応のうち、いかなるものを遮断してもつねにプリンヌクレオシドの生産能が向上するとはかぎらない。微生物がプリンヌクレオシドを生産する時期に、プリンヌクレオシド中間体あるいはプリンヌクレオシドを他の代謝産物に変換する方向の反応が進行している場合に、同反応を遮断することがプリンヌクレオシド生産性向上につながる可能性がある。

プリンヌクレオシド生合成経路から分岐して他の代謝産物にいたる反応のうち、それを遮断することによって実際にプリンヌクレオシド生産性向上につながるものは、プリンヌクレオシド生合成経路図がすでに明らかになっているので、これに基づき予測される。

プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応を遮断する方法としては、その反応を触媒する酵素を欠失させるか、あるいは、その反応を触媒する酵素を不活化させる方法などがあげられる。酵素を欠失させるには、その酵素をコードする遺伝子を欠失させる方法があげられる。酵素を不活化させるには、その酵素をコードする遺伝子に変異を導入するか、あるいはその酵素を特異的に不活化する薬剤を添加する方法などがある。

プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応のうち、そ

れを遮断することによって実際にプリンヌクレオシド生産性向上につながるものとしては、サクシニル-AMPシンターゼ、プリンヌクレオシド・フォスホリラーゼ、アデノシン・デアミナーゼ、イノシン-グアノシン・キナーゼ、GMPリダクターゼ、6-フォスフォグルコン酸デヒドラーゼ、フォスフォグルコース・イソメラーゼ、アデニン・デアミナーゼ、キサントシン・フォスホリラーゼから選ばれる酵素に触媒される反応があげられる。

例えば、IMPからサクシニルAMPへの分岐を遮断し、かつイノシンからヒポキサンチンへの転換を遮断すると、同遮断の結果IMPはAMPへ転換されることがなくなり、かつイノシンからヒポキサンチンへ転換されることがなくなる。そして、イノシンが蓄積されることが予想される。これらの有効性を確認するためには目的に応じて取得した変異株を培養してイノシンの生産性を見ればよい。

後述の実施例では、E. coliにおいてサクシニル-AMPシンターゼ遺伝子（*purA* 遺伝子）を破壊してアデニン要求性を付与したとき、E. coliのアデニン要求株を生育させるのにアデニンないしはアデノシン等のAMP系物質の培地への添加が必要となった。しかし、これらの添加物質は、E. coliにおいてはただちにイノシンあるいはヒポキサンチンに転換され、AMP系物質の消化により、一定のところで生育が停止してしまう性質が見いだされた。そこでその生育を維持させる手段として、E. coliの代謝経路から判断してアデノシンからイノシンへの転換に関与するアデノシン・デアミナーゼあるいはアデニンからヒポキサンチンへの転換に関与するアデニン・デアミナーゼを不活化する必要性が予測された。このようにして、アデノシン・デアミナーゼあるいはアデニン・デアミナーゼの不活化による効果は確認され、イノシンの蓄積向上効果が観察された。

またGMPレダクターゼはGMPをIMPに転換する反応に関わるが、GMPレダクターゼを不活化することによりグアノシンの生産性向上が予想される。後述の実施例に示すように若干のグアノシン蓄積向上が認められた。

またプリンヌクレオシドを生産するのにグルコース等の炭素源が使用されるが、使用する炭素源や培養条件により、プリンヌクレオシド生合成にいたる糖代謝系に差違が生じることが知られている。それゆえ、プリンヌクレオシド生合成へと代謝系を有利に導くために、ペントースリン酸経路を優先させるように他への分

岐を遮断することが考えられる。その手段として、6-フオスフォグルコン酸デヒドラーゼやフオスフォグルコース・イソメラーゼを不活化することを行ったところ、そのイノシン生産への有効性が確認された。

(4) プリンヌクレオシドの細胞内への取り込みを弱化することによってプリンヌクレオシドの生産能を獲得した微生物

細胞外に排出したプリンヌクレオシドをふたたび細胞内へ取り込むことはプリンヌクレオシドを蓄積する上では、エネルギー的に不合理なことと考えられるので、プリンヌクレオシドの取り込みを弱化することは有効なことである。

プリンヌクレオシドの細胞内への取り込みを弱化させる手段としては、プリンヌクレオシドの細胞透過性に関与する反応を遮断することが挙げられる。反応の遮断は上記(3)に説明したのと同様にして行うことができる。

例えば、プリンヌクレオシドの細胞内への取り込みに関与するパーミターゼの一つであるヌクレオシドパーミターゼを不活化することによってイノシンの蓄積向上効果が観察された。

(5) プリンヌクレオシドの製造法

プリンヌクレオシド生産能を獲得した微生物を用いて発酵法によってプリンヌクレオシドを製造する方法を以下説明する。

使用するプリンヌクレオシド生産用培地は、炭素源、窒素源、無機イオンおよび必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地でよい。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、アラビノース、マルトース、キシロース、トレハロース、リボースや澱粉の加水分解物などの糖類、グリセロール、マンニトールやソルビトールなどのアルコール類、グルコン酸、フマル酸、クエン酸やコハク酸等の有機酸類を用いることができる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。有機微量栄養素としては、ビタミンB1等のビタミン類、アデニンやRNA等の核酸類などの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カルシウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

培養は好氣的条件下で 16～72 時間程度実施するのがよく、培養温度は 30℃～45℃に、培養中 pH は 5～8 に制御する。なお、pH 調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、さらにアンモニアガス等を使用することができる。

発酵液からのプリンヌクレオシドの採取は通常、イオン交換樹脂法、沈殿法その他の公知の方法を組合せることにより実施できる。

(6) プリンヌクレオシド生産菌の具体例

まずエシェリヒア・コリ(E.coli) K12のW3110株(ATCC27325)の染色体DNAより PCR法を用いて P R P P アミドトランスフェラーゼ (PRPP amidotransferase) をコードする遺伝子である purF、プリン・リプレッサー (purine repressor) をコードする遺伝子である purR、プリンヌクレオシド・フォスフォリラーゼ (purine nucleoside phosphorylase) をコードする遺伝子である deoD、サクシニル-AMP シンターゼ (succinyl-AMP synthase) をコードする遺伝子である purA、アデノシン・デアミナーゼ (adenosine deaminase) をコードする遺伝子である add、イノシン-グアノシン・キナーゼ (inosine-guanosine kinase) をコードする遺伝子である gsk、GMP レダクターゼ (GMP reductase) をコードする遺伝子である guaC、6-フォスフォグルコン酸デヒドラーゼ (6-phosphogluconate dehydrase) をコードする遺伝子である edd、フォスフォグルコース・イソメラーゼ (phosphoglucose isomerase) をコードする遺伝子である pgi、アデニン・デアミナーゼ (adenine deaminase) をコードする遺伝子である yicP、P R P P シンセターゼ (PRPP synthetase) をコードする遺伝子である prs、キサントシン・フォスフォリラーゼ (xanthosine phosphorylase) をコードする遺伝子である xapA およびヌクレオシド・パーミアーズ (nucleoside permase) をコードする遺伝子である nupG をクローニングし、これらの遺伝子をそれぞれの目的に応じて変異させる。この際使用する染色体 DNA は E.coli 由来であればどの菌株でもよい。

purF に導入する変異とは、purF を破壊するための変異と、P R P P アミドトランスフェラーゼのフィードバック阻害を解除するための変異である。purR に導入する変異とは、purR を破壊するための変異である。deoD に導入する変異とは、de

oDを破壊するための変異である。purAに導入する変異とは、purAを破壊するための変異である。addに導入する変異とは、addを破壊するための変異である。gskに導入する変異とは、gskを破壊するための変異である。

guaCに導入する変異とは、guaCを破壊するための変異である。eddに導入する変異とは、eddを破壊するための変異である。pgiに導入する変異とは、pgiを破壊するための変異である。yicPに導入する変異とは、yicPを破壊するための変異である。prsに導入する変異とは、P R P Pシンセターゼのフィードバック阻害を解除するための変異である。xapAに導入する変異とは、xapAを破壊するための変異である。nupGに導入する変異とは、nupGを破壊するための変異である。

遺伝子に変異を生じさせるには、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H.J., *Methods in Enzymology*, 154, 350(1987))、リコンビナントPCR法 (PCR Technology, Stockton Press(1989))、特定の部分のDNAを化学合成する方法あるいは当該遺伝子をヒドロキシアミン処理する方法や当該遺伝子を保有する菌株を紫外線照射処理、もしくはニトロソグアニジンや亜硝酸などの化学薬剤処理をする方法がある。また遺伝子の機能を完全に不活化する目的の場合には適当な制限酵素サイトにDNAの付加や欠失を入れる方法がある。

次に、P R P PアミドトランスフェラーゼおよびP R P Pシンセターゼのフィードバック阻害を解除するための変異が導入されたpurFおよびprsを組換えDNAとして適当な微生物に導入し、発現させることにより、フィードバック阻害が実質的に解除されたP R P Pアミドトランスフェラーゼ遺伝子(purF)およびP R P Pシンセターゼ遺伝子(prs)を保有する微生物を取得する。以上の方法で取得される組換えDNAとは、フィードバック阻害を解除したP R P Pアミドトランスフェラーゼ遺伝子(purF)およびP R P Pシンセターゼ遺伝子(prs)等の有用遺伝子をパッセンジャーとして、プラスミドやファージDNAのベクターに組込んだものをいう。その際、該有用遺伝子の発現を効率的に実施するために、lac, trp, tac, trc, PLその他の微生物内で機能するプロモーターを用いてもよい。

なお、ここでのいう組換えDNAには、該有用遺伝子をトランスポゾン(Berg, D.E. and Berg, C.M., *Bio/Technol.*, 1, 417(1983))、Muファージ (特開平2-109985)または相同組換え用プラスミド等を用いた方法で染色体に組込んだものも含まれる。

相同組換え用プラスミドとしては、温度感受性複製起点を有するプラスミドが使用される。温度感受性複製起点を有するプラスミドは、許容温度 (permissive temperature)、例えば 30°C 付近では複製できるが、非許容温度 (non-permissive temperature)、例えば 37°C~42°C では複製できない。温度感受性複製起点を有するプラスミドを用いた相同組換え法では、必要に応じて、許容温度でプラスミドを複製させたり、非許容温度でプラスミドを宿主から脱落させたりすることができる。後述の実施例では、相同組換え用プラスミドとして、pMAN997を使用した。pMAN997はpMAN031(J.Bacteriol., 162, 1196(1985))とpUC19 (宝酒造社製) のそれぞれVsp I -HindIII断片を繋ぎ換えたものである (図1)。

また相同組換え法(Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab.(1972))を用いて染色体上の特定の遺伝子機能を不活化し、プリンヌクレオシドの生産能を向上させた。不活化される遺伝子とは、その不活化によってプリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の遺伝子の発現量が上昇するものである。具体的には、染色体上のプリン・リプレッサー遺伝子(purR)を破壊してP R P P アミドトランスフェラーゼ遺伝子(purF)を始めとするプリンヌクレオチド生合成遺伝子の発現抑制機構の解除を行った。

さらに、プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を破壊した。具体的には、プリンヌクレオシド・フォスフォリラーゼ遺伝子(deoD)を破壊して、イノシンおよびグアノシンのヒポキサンチンおよびグアニンへの分解を抑制した。また、サクシニル-AMP シンターゼ遺伝子(purA)を破壊して、アデニン要求性を付与した。さらに、アデノシン・デアミナーゼ遺伝子(add)を破壊してアデノシンからイノシンへの転換を抑制した。イノシン-グアノシン・キナーゼ遺伝子(gsk)を破壊してイノシンおよびグアノシンからIMPおよびGMPへの転換を抑制した。GMPリダクターゼ遺伝子(guaC)を破壊してGMPからIMPへの転換を抑制した。6-フォスフォグルコン酸デヒドラーゼ遺伝子(edd)を破壊して、糖がエントナー-ドウドロフ (Entner-Doudoroff)経路で代謝されるのを抑制した。フォスフォグルコース・イソメラーゼ遺伝子(pgi)を破壊して、糖が解糖経路で代謝されるのを抑制し、ペントースリン酸経路への流入を計った。アデニン・デアミナーゼ遺伝子(yicP)を

破壊し、アデニンからヒポキサンチンへの転換を抑制した。キサントシン・フォスフォリラーゼ遺伝子(xapA)を破壊して、キサントシンからキサンチンへの誘導分解を抑制するとともにイノシンやグアノシンのヒポキサンチンやグアニンへの分解を抑制した。もちろん、当該遺伝子を保有する菌株を紫外線照射処理、もしくはニトロソグアニジンや亜硝酸などの化学薬剤処理して、目的の遺伝子の機能を不活化することも行われる。

組換えDNAを有する微生物としては、該P R P Pアミドトランスフェラーゼ等の目的の酵素をコードする遺伝子が発現するエシェリヒア属に属する微生物を用いた。

また該P R P Pアミドトランスフェラーゼ遺伝子(purF)の効率的活用のために他の有用遺伝子、例えばPRPPからIMP生成に関わるpurF以外の遺伝子(purD, purT, purL, purM, purK, purE, purC, purB, purH)、I M Pデヒドロゲナーゼ遺伝子(guaB)、G M Pシンセターゼ遺伝子(guaA)やP R P Pシンセターゼ遺伝子(prs)等と組合せて利用するとよい。その際、これらの有用遺伝子は該P R P Pアミドトランスフェラーゼ遺伝子(purF)と同じく、宿主の染色体上に存在しても、プラスミドやファージ上に存在してもよい。

以上の方法で取得されるpurA（サクシニル-AMPシンターゼ遺伝子）欠失、および／またはdeoD（プリンヌクレオシド・フォスフォリラーゼ遺伝子）欠失、および／またはpurR（プリン・リプレッサー遺伝子）欠失、および／または脱感作型purF（P R P Pアミドトランスフェラーゼ遺伝子）、および／またはadd（アデノシン・デアミナーゼ遺伝子）欠失、および／またはgsk（イノシン-グアノシン・キナーゼ遺伝子）欠失、および／またはguaC（G M Pリダクターゼ遺伝子）欠失、および／またはedd（6-フォスフォグルコン酸デヒドラーゼ遺伝子）欠失、および／またはpgi（フォスフォグルコース・イソメラーゼ遺伝子）欠失、および／またはyicP（アデニン・デアミナーゼ遺伝子）欠失、および／またはxapA（キサントシン・フォスフォリラーゼ遺伝子）欠失、および／またはnupG（ヌクレオシドパーミターゼ遺伝子）欠失を有する微生物、あるいは脱感作型P R P Pアミドトランスフェラーゼ遺伝子(purF)、および／または脱感作型prs（P R P Pシンセターゼ遺伝子）を含む組換えDNAで形質転換された本微生物を培養し、

培養液に目的のイノシンおよびグアノシン等のプリンヌクレオシドを生成蓄積せしめ、これを採取する。

図面の簡単な説明

図1は、pMAN997の構築を示す。

図2は、相同組換え用遺伝子の構造を示す。図中の数字は、取得された断片の長さ(bp)および5'側からの位置を示す。

図3は、相同組換え用遺伝子の構造を示す。図中の数字は、取得された断片の長さ(bp)および5'側からの位置を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例1

1) P R P P アミドトランスフェラーゼ遺伝子(purF)欠失株の取得

E. coli K12のW3110株(ATCC27325)の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク (GenBank Accession No.M26893) の情報に基づき作製された、CTCCTGCAGAACGAGGAAAAAGACGTATG (配列番号1) とCTCAAGCTTTCATCCTTCGTTATGCATTTTCG (配列番号2) の塩基配列を有する29merと31merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model9600 (パナソニック社製)) を行い、SD-ATGと翻訳終止コドンのカバーするpurF構造遺伝子領域の約1530bpの増幅断片をpCRTMIIベクター (Invitrogen社製) にクローン化した。本ベクターにはPCR産物増幅断片をそのままクローニングすることができ、また、クローニングサイトの両近傍に制限酵素サイトとしてEcoRIサイトが存在する。またPCR用プライマーにはPstIサイトとHindIIIサイトがそれぞれデザインされている。

クローン化された1530bpのpurF断片の5'側から約880bpの位置にBglIIサイトが1ヶ所あるが、pCRTMIIベクターそのものにもBglIIサイトが1ヶ所あるので、プラスミドをBglIIで部分消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化した後に、T4 DNA リガーゼで連結した。このライゲーション液でE. coli HB101のコンピテント細胞(competent cell)を形質転換し、アンピシリン25 µg/mlを含むLB(トリブ

トン 1%, イーストエキストラクト 0.5%, NaCl 0.1%, グルコース 0.1%, pH7) 寒天プレートに生育する形質転換体を得た。18クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からEcoRI消化で約1550bpの断片が得られ、かつBglIIで本断片が切断されないプラスミドDNA(pCRTMIIpurF' #14)を選択した。本プラスミドDNAが有するpurFはBglIIサイトでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図2)。

次に、pCRTMIIpurF' #14をEcoR I 消化し、purFを含む約1.6Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997 (図1に示されるように、pMAN031(J.Bacteriol., 162, 1196(1985))とpUC19 (宝酒造社製)のそれぞれVsp I -HindIII断片を繋ぎ換えたもの)のEcoR I サイトに挿入し、プラスミドpMAN997purF' #14を得た。プラスミドpMAN997purF' #14でE. coli W3110株(野生株)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 µg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 µg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地(3ml/試験管)に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(10^{-5} ~ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 µg/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から最小培地(1L当たりNa₂HP0₄ 6.8g, KH₂PO₄ 3g, NaCl 0.5g, NH₄Cl 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, CaCl₂·2H₂O 15mg, チアミンHCl 2mg, グルコース 0.2g)に生育せず、ヒボキサンチン 50mg/L添加最小培地には生育するクローンを選択した。さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりpurFを含む約1.5kb断片を増幅させ、BglIIで切断されない

ことを確認した。以上を満足するクローンをpurF欠失株とし、ここではF-2-51株およびF-1-72株とした。

2) サクシニルーAMPシンターゼ遺伝子(purA)欠失株の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク (GenBank Accession No.J04199) の情報に基づき作製された、CTCGAGCTCATGGGTAACAACGTCGTCGTAC (配列番号3) とCTCGTCGACTTACGCGTCGAACGGGTCGCGC (配列番号4) の塩基配列を有する31merと31merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model9600(パナソニック社製)) を行い、ATGと翻訳終止コドンのカバーするpurA構造遺伝子領域の約1300bpの増幅断片をpUC18ベクター (宝酒造社製) のSac I サイトとSal I サイトの間にクローン化した。なお、PCR用プライマーにはSac I サイトとSal I サイトがそれぞれデザインされている。クローン化されたpurA断片の約1300bpの5'側から約520bpと710bpの位置にそれぞれHpa I およびSnaB I サイトが1ヶ所あるのでプラスミドをHpa I およびSnaB I で消化し、約190bp断片を除去したものを得る目的でT4 DNA リガーゼで連結した。このライゲーション液でE.coli JM109のコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン25 µg/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。18クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からFsp I では切断せず、Sac I およびSal I での切断で約1100bpの断片が得られるプラスミドDNA(pUC18purA' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するpurAはHpa I およびSnaB I サイトの間に欠失が生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される (図2)。

次に、pUC18purA' #1をSac I とSal I 消化し、purAを含む約1.1Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997 (上述) のSac I サイトとSal I サイトの間に挿入し、プラスミドpMAN997purA' #1を得た。プラスミドpMAN997purA' #1でF-2-51株 (purF⁻) を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 µg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 µg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで

生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地（3ml/試験管）に接種し、42°Cで3～4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈（ 10^{-5} ～ 10^{-6} 程度）し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中からヒポキサンチン 50mg/L添加最小培地に生育せず、アデニン 50mg/L添加最小培地には生育するクローンを選択した。さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりpurA約1.1kb断片を増幅させ、野生型（約1.3kb）よりサイズが小さいこと、およびFsp Iで切断されないことを確認した。以上を満足するクローンをpurA欠失株とし、ここではFA-31株とした。

3) プリンヌクレオシド・フォスホリラーゼ遺伝子(deoD)欠失株の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク (E. coli Gene Bank) において「deoD」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、CTCGTCGACGCGGGTCTGGAAGTGTTCGAC（配列番号5）とCTCGCATGCCCGTGCTTTACCAAAGCGAATC（配列番号6）の塩基配列を有する30merと31merの両端プライマーによるPCR法（94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model9600（パナソニック社製））を行い、SD-ATGと翻訳終止コドンのカバーするdeoD構造遺伝子領域を含む約1350bpの増幅断片をpCRTMIIベクター（Invitrogen社製）にクローン化した。本ベクターにはクローニングサイトの両近傍に制限酵素サイトとしてEcoRIサイトが存在する。またPCR用プライマーにはSal I サイトとSph I サイトがそれぞれデザインされている。クローン化されたdeoD断片の約1350bpの5'側から約680bpの位置にHpa I サイトが1ヶ所あるのでプラスミドをHpa Iで消化し、消化されたプラスミドと10merのCla I リンカーとを混

合してT4 DNA リガーゼ反応を行った。この結果、HpaIサイトにClaIサイトが挿入された。このライゲーション液でE.coli HB101のコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。16クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からHpa Iでは切断せず、Cla Iで切断されるプラスミドDNA(pCRTMI IdeoD' #16)を選択した。本プラスミドDNAが有するdeoDはHpa Iサイトでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図2)。

次に、pCRTMI IdeoD' #16をEcoR I消化し、deoDを含む約1.35Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(上述)のEcoR Iサイトに挿入し、プラスミドpMAN997deoD' #16を得た。プラスミドpMAN997deoD' #16でF-1-72株(purF⁻)およびFA-31株(purF⁻, purA⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地(3ml/試験管)に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(10^{-5} ~ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンをイノシン 1g/L添加LB培地に生育させ、これらの培養液を薄層クロマトグラムにより分析して、イノシンがヒポキサンチンに分解していないクローンを選択した。さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりdeoDを含む約1.35kb断片を増幅させ、Cla Iで切断されるがHpa Iで切断されないことを確認した。以上を満足するクローンをdeoD欠失株とし、F-1-72株(purF

-) およびFA-31株(*purF*⁻, *purA*⁻)由来のものをそれぞれFD-6株およびFAD-25株とした。

4) プリン・リプレッサー遺伝子(*purR*)欠失株の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク (*E. coli* Gene Bank) において「*purR*」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、CTCGTCGACGAAAGTAGAAGCGTCATCAG (配列番号 7) と CTCGCATGCTTAACGACGATAGTCGCGG (配列番号 8) の塩基配列を有する 29mer と 28mer の両端プライマーによる PCR 法 (94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30 サイクル; Gene Amp PCR System Model 9600 (ハートウェル社製)) を行い、ATG と翻訳終止コドンのカバーする *purR* 構造遺伝子領域および ATG の 5' 上流域約 800bp を含む約 1.8kb の増幅断片を pUC19 ベクター (宝酒造社製) の Sal I サイトおよび Sph I サイトの間にクローン化した。PCR 用プライマーには Sal I サイトと Sph I サイトがそれぞれデザインされており、このサイトがクローニングに利用された。クローン化された *purR* 断片の約 1.8kb の 5' 側から約 810bp の位置に PmaC I サイト (*purR* 構造遺伝子領域での N 末端近傍) が 1 ヶ所あるのでプラスミドを PmaC I で消化した。消化されたプラスミドと 8mer の Bgl II リンカーを混合して T4 DNA リガーゼ反応を行った。この結果、PmaC I サイトに Bgl II サイトが挿入された。このライゲーション液で *E. coli* JM109 のコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン 25 μg/ml を含む LB 寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10 クローンの形質転換体からプラスミド DNA を調製し、この中から PmaC I では切断せず、Bgl II で切断されるプラスミド DNA (pUC19*purR*' #2) を選択した。本プラスミド DNA が有する *purR* は PmaC I サイトでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される (図 2)。

次に、pUC19*purR*' #2 を Sac I と Sph I で消化し、*purR* を含む約 1.8Kb の断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点 (*tsori*) を有する相同組換え用ベクターである pMAN997 (上述) の Sac I サイトと Sph I サイトの間に挿入し、プラスミド pMAN997*purR*' #2 を得た。プラスミド pMAN997*purR*' #2 で FD-6 株 (*purF*⁻, *deoD*⁻) および FAD-25 株 (*purF*⁻, *purA*⁻, *deoD*⁻) を 30°C で形質転換し、得られたコロニーの複数

個をアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地（3ml/試験管）に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(10^{-5} ~ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から10クローンを無作為に選び、これらの染色体DNAからPCRによりpurRを含む約1.8kb断片を増幅させ、BglIIで切断されるがPmaCIで切断されないクローンを選択した。これらのクローンをpurR欠失株とし、FD-6株 (purF⁻, deoD⁻) およびFAD-25株 (purF⁻, purA⁻, deoD⁻)由来のものをそれぞれFDR-18株およびFADR-8株とした。なお、purRが破壊された株では、PRPPアミドトランスフェラーゼ活性がpurR非破壊株に比べて増大していることが、deoDおよびpurRが欠失したpurF⁺株や、purA、deoDおよびpurRが欠失したpurF⁺株を用いて確認された。PRPPアミドトランスフェラーゼ活性の測定はL.J.Messengerら(J.Biol.Chem., 254, 3382(1979))の方法に従って行った。

5)脱感作型PRPPアミドトランスフェラーゼ遺伝子(purF)の作製

1)でpCRTMIIベクター (Invitrogen社製) にクローン化した約1530bpのpurFを搭載したプラスミドよりPst I とHindIIIでの消化によりpurF断片を切り出し、変異導入用プラスミドpKF18 (宝酒造社製) のマルチクロニングサイトのPst I サイトとHindIIIサイトの間に挿入し直し、目的のクローンを得た(pKFpurF)。G.Zhouら(J.Biol.Chem., 269, 6784(1994))により、PRPPアミドトランスフェラー

ゼ(PurF)の326位のLys(K)がGln(Q)に変異したもの、さらに410位のPro(P)がTrp(W)に変異したものがいずれもGMPおよびAMPのフィードバック阻害に対して脱感作されていることが示されている。そこで、PRPPアミドトランスフェラーゼ(PurF)の326位のLys(K)をGln(Q)に、410位のPro(P)をTrp(W)に変異できるような遺伝子置換を行うために以下の合成DNAプライマーを作製し、Site-directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Km (宝酒造社製)のプロトコールに従って、pKFpurFに部位特異的変異を導入した。

K326Q変異用プライマー: 5'-GGGCTTCGTT CAG AACCGCTATGTTGG-3' (配列番号 9)

P410W変異用プライマー: 5'-TATGGTATTGATATG TGG AGCGCCACGGAAC-3' (配列番号 10)

変異導入操作後、得られた形質転換体のそれぞれ6クローンずつをランダムにピックアップし、プラスミドを調製し、変異導入個所周辺の塩基配列を解析した結果、目的のものが得られたことが確認された。得られたプラスミドはそれぞれpKFpurFKQおよびpKFpurFPWとした。さらにpKFpurFKQにP410W(410Pro→Trp)の変異を同じ方法で導入し、二つの変異を同時に持つ変異型プラスミドpKFpurFKQPWも作製した。また本pKFpurFKQ、pKFpurFPW、およびpKFpurFKQPWはpKF18由来のlacp/o (ラクトースオペロンのプロモーター) の下流に変異型(脱感作型)のpurFが挿入されており、本プロモーターの支配下にpurFが発現する。

またこれらのプラスミドでE.coli JM109を形質転換した組換え体をLB液体培地で8時間培養した後に菌体を集め、粗酵素抽出液を調製した。これらのPRPPアミドトランスフェラーゼ活性およびAMPやGMPによる阻害度の測定をL.J.Messengerら(J.Biol.Chem., 254, 3382(1979))の方法に従って行った。その結果を表1に示す。

表 1
P R P P アミドトランスフェラーゼ活性およびAMPやGMPによる阻害

| 宿主 | プラスミド | P R P P アミドトランスフェラーゼ活性 ($\mu\text{mole/min/mg}$) | | |
|-------|-------------|---|----------|----------|
| | | なし | 10mM AMP | 10mM GMP |
| JM109 | - | 0.001 | - | - |
| JM109 | pKFpurF | 0.68 | 0.48 | 0.10 |
| JM109 | pKFpurFKQ | 0.34 | 0.32 | 0.33 |
| JM109 | pKFpurFKQPW | 0.18 | 0.16 | 0.17 |

6)変異型purFプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

4)で作製したFDR-18株(purF^- , deoD^- , purR^-)およびFADR-8株(purF^- , purA^- , deoD^- , purR^-)にpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWを導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。

以下に、プリンヌクレオシド生産能の評価のための、プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法を示す。

1. 基本培地：M S 培地

最終濃度

| | |
|---|--------------|
| グルコース | 40 g/L (別殺菌) |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 16 g/L |
| KH_2PO_4 | 1 g/L |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1 g/L |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 g/L |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 g/L |
| イーストエキストラクト | 2 g/L |
| CaCO_3 | 30 g/L (別殺菌) |

2. 培養方法

リフレッシュ(refresh)培養；保存状態の菌を接種

LB寒天培地（必要に応じて薬剤添加）

37°C、一晚

種(seed)培養；リフレッシュ培養した菌を接種

LB液体培地（必要に応じて薬剤添加）、37°C、一晚

主(main)培養；種培養液体培地から2%接種

MS培地（必要に応じてアデニン、薬剤添加）

37°C、20ml/500ml容坂口フラスコ

3. 分析方法

培養液500 μ lを経時的にサンプリングし、15,000rpmで、5分間遠心し、その上清液をH₂Oにて4倍希釈後、HPLC分析する。特記しない限り3日間培養後の培地当たりのプリンヌクレオシド蓄積量として評価する。

分析条件：

カラム：Asahipak GS-220 (7.6mmID×500mmL)

緩衝液：0.2M NaH₂PO₄(pH3.98) リン酸にてpH調整

温度：55°C

流速：1.5ml/min

検出：UV254nm

| 保持時間 | (min) |
|---------|-------|
| イノシン | 16.40 |
| ヒポキサンチン | 19.27 |
| グアノシン | 20.94 |
| グアニン | 23.55 |
| アデニン | 24.92 |
| アデノシン | 26.75 |

なお、purA⁻(アデニン要求性)の菌株についてはMS培地にアデニン 5mg/Lが添

加される。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表2に示す。変異型purFプラスミド導入株では、痕跡量(trace)の生産しか認められないW3110株（野生株）に比べ、優位なイノシンの生産が認められた。

表2
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|--------|-------------|-------------|-------------|
| | | イノシン(mg/L) | グアノシン(mg/L) |
| W3110 | - | trace | 0 |
| FDR-18 | pKFpurFKQ | 115 | 0 |
| FDR-18 | pKFpurFKQPW | 110 | 0 |
| FADR-8 | pKFpurFKQ | 66 | 0 |
| FADR-8 | pKFpurFKQPW | 62 | 0 |

実施例2

1) アデノシン・デアミナーゼ遺伝子(add)欠失株の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク (E. coli Gene Bank) において「add」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、CTCGTCGACGGCTGGATGCCTTACGCATC (配列番号11) とCTCGCATGCAGTCAGCACGGTATATCGTG (配列番号12) の塩基配列を有する29merと29merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model 9600 (パナソニック社製)) を行い、ATGと翻訳終止コドンのカバーするadd構造遺伝子領域およびATGの5' 上流域約420bpおよび翻訳終止コドンの下流域約370bpを含む約1.8kbの増幅断片をpUC19ベクター (宝酒造社製) のSal I サイトとSph I サイトの間にクローン化した。PCR用プライマーにはSal I サイトとSph I サイトがそれぞれデザインされており、このサイトをクローニングに利用した。クローン化されたadd断片の約1.8kbの5' 側から約880bpの位置にStu I サイトが1ヶ所あるのでプラスミドをStu I で消化した。消化されたプラスミドと8merのBgl II リ

ンカーとを混合し、T4 DNAリガーゼ反応を行った。この結果、StuIサイトにBglII Iサイトが挿入された。このライゲーション液でE.coli JM109のコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からStuIでは切断されず、BglIIIで切断されるプラスミドDNA(pUC19add' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するaddはStuIサイトでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図2)。

次に、pUC19add' #1をSac I とSph I で消化し、addを含む約1.8Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(図1)のSac I とSph I サイトの間に挿入し、プラスミドpMAN997add' #1を得た。プラスミドpMAN997add' #1でFDR-18株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻)およびFADR-8株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地(3ml/試験管)に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(10^{-5} ~ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンをアデノシン1.5g/L添加LB培地に生育させ、これらの培養液を薄層クロマトグラムにより分析して、アデノシンがイノシンに転換していないクローンを選択した。さらにこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりadd約1.8kb断片を増幅させ、BglIIIで切断されるがStuIで切断されないことを確認した。これらのクローンをadd欠失株と

し、FDR-18株 (purF^- , deoD^- , purR^-) およびFADR-8株 (purF^- , purA^- , deoD^- , purR^-) 由来のものをそれぞれFDRadd-18-1株およびFADRadd-8-3株とした。

2) 脱感作型 purF プラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

1) で作製したFDRadd-18-1株 (purF^- , deoD^- , purR^- , add^-) およびFADRadd-8-3株 (purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^-) に pKFpurFKQ および pKFpurFKQPW を導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。なお、FADRadd-8-3株については野生型 purF プラスミド (pKFpurF) による形質転換体も作製し、 pKFpurFKQ による形質転換体および pKFpurFKQPW による形質転換体と比較評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例 1 と同じである。 purA^- (アデニン要求性) の菌株についてはMS培地にアデニン 5mg/L が添加されている。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表 3 に示す。W3110株 (野生株) に比べ、優位なイノシンの生産が認められた。また、野生型 purF に比べ、脱感作型 purFKQ および purFKQPW の効果が認められた。

表 3
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|-------------|----------------------|-------------|--------------|
| | | イノシン (mg/L) | グアノシン (mg/L) |
| W3110 | - | trace | 0 |
| FDRadd-18-1 | pKFpurFKQ | 220 | 0 |
| FDRadd-18-1 | pKFpurFKQPW | 215 | 0 |
| FADRadd-8-3 | pKFpurFKQ | 1080 | 0 |
| FADRadd-8-3 | pKFpurFKQPW | 1030 | 0 |
| FADRadd-8-3 | pKFpurF | 805 | 0 |

実施例 3

1) 脱感作型 purF 相同組換えプラスミドの作製

実施例 1 の 1) で作製した purF^- 株を利用して脱感作型 purF を染色体置換するた

めに、先に取得したpurF断片（約1.6kb）よりもさらに3'側に約0.5kb長いpurF断片を取得した。W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク（E. coli Gene Bank）の情報に基づき、CTCCTGCAGAACGAGGAAAAAGACGTATG（配列番号1）とCTCAAGCTTGTCTGATTTATCACATCATC（配列番号13）の塩基配列を有する29merと29merの両端プライマーによるPCR法（94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model 9600（パナソニック社製））を行い、SD-ATGと翻訳終止コドンのカバーするpurF構造遺伝子領域を含む約2.1kbの増幅断片をpCRTMIIベクター（Invitrogen社製）にクローン化した。このクローンの保持するプラスミドをpCRTMIIpurFLとする。pCRTMIIpurFLにはクローニングサイトの両近傍に制限酵素サイトとしてEcoRIサイトが存在する。またPCR用プライマーにはPstIサイトとHindIIIサイトがそれぞれデザインされている。

次にpCRTMIIpurFLをSnaBIとHindIIIで消化し、purFのコーディング領域のC末端より下流の約0.65kbの断片を得た。この断片を実施例1の5)で得たpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWのSnaBIサイトとHindIIIサイトとの間に挿入し、pKFpurFLKQおよびpKFpurFLKQPWを作製した。

次に、pKFpurFLKQおよびpKFpurFLKQPWをEcoRIとHindIIIで消化し、purFLKQおよびpurFLKQPWを含む約2.1Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997（上述）のEcoRIサイトとHindIIIサイトとの間に挿入し、それぞれプラスミドpMAN997purFLKQおよびpMAN997purFLKQPWを得た。

2) 脱感作型purF染色体組込み株の作製

プラスミドpMAN997purFLKQおよびpMAN997purFLKQPWでそれぞれFDRadd-18-1株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻) およびFADRadd-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体

に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した後に、LB液体培地（3ml/試験管）に接種し、42℃で3～4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈（ 10^{-5} ～ 10^{-6} 程度）し、LB寒天プレートに塗布し、42℃で一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から、FDRadd-18-1株（ purF^- , deoD^- , purR^- , add^- ）の場合には最小培地に生育し、FADRadd-8-3株（ purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- ）の場合にはL-ヒスチジン 100mg/Lおよびアデニン 50mg/L添加最小培地に生育するクローンを選択した。

さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRにより purF を含む約1.5kb断片を増幅させ、相同組換え置換による変異導入個所周辺の塩基配列を解析した結果、K326Q(326Lys→Gln)の変異、およびK326Q(326Lys→Gln)+P410W(410Pro→Trp)の変異をそれぞれが持つことが確認された。

FDRadd-18-1株（ purF^- , deoD^- , purR^- , add^- ）由来のものをFDRadd-18-1::KQ株（ purFKQ , deoD^- , purR^- , add^- ）およびFDRadd-18-1::KQPW株（ purFKQPW , deoD^- , purR^- , add^- ）とし、FADRadd-8-3株（ purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- ）由来のものをFADRadd-8-3::KQ株（ purFKQ , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- ）およびFADRadd-8-3::KQPW株（ purFKQPW , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- ）と命名した。

3) 脱感作型 purF 染色体組込み株のプリンヌクレオシド生産能評価

2) で作製したFDRadd-18-1::KQ株（ purFKQ , deoD^- , purR^- , add^- ）、FDRadd-18-1::KQPW株（ purFKQPW , deoD^- , purR^- , add^- ）、FADRadd-8-3::KQ株（ purFKQ , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- ）およびFADRadd-8-3::KQPW株（ purFKQPW , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- ）のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。 purA^- （アデニン要求性）の菌株についてはMS培地にアデニン 5mg/Lが添加されている。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表4に示す。W3110株（野生株）に比べ、優位なイノシン生産が認められた。

表4
プリンヌクレオシド生産能評価

| 菌株 | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|-------------------|-------------|-------------|
| | イノシン(mg/L) | グアノシン(mg/L) |
| W3110 | trace | 0 |
| FDRadd-18-1::KQ | 110 | 0 |
| FDRadd-18-1::KQPW | 105 | 0 |
| FADRadd-8-3::KQ | 635 | 0 |
| FADRadd-8-3::KQPW | 620 | 0 |

実施例4

1) イノシン-グアノシン・キナーゼ遺伝子(gsk)欠失株の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク（GenBank Accession No.D00798）の情報に基づき、CTCGAGCTCATGAAATTTCCCGG（配列番号14）とCTCGGATCCGGTACCATGCTG（配列番号15）の塩基配列を有する23merと21merの両端プライマーによるPCR法（94℃, 30sec; 55℃, 1min; 72℃, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model9600（パナソニック社製））を行い、ATGと翻訳終止コドンのカバーするgsk構造遺伝子領域を含む約1.5kbの増幅断片をpUC18ベクター（宝酒造社製）のSac I サイトとBamH I サイトの間にクローン化した。PCR用プライマーにはSac I サイトとBamH I サイトがそれぞれデザインされている。

クローン化されたgsk断片の約1.5kbの5'側から約830bpの位置にBgl II サイトが1ヶ所あるのでプラスミドをBgl II で消化し、そこにカナマイシン耐性（Km^r）遺伝子GenBlock（BamH I 消化物、ファルシアバイオテック社製）を挿入する目的でT4 DNA リガーゼ反応を行った。このライゲーション液でE.coli JM109のコンピテント細胞を形質転換し、カナマイシン50 µg/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。4クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からBgl II

Iでは切断されず、EcoR I と Sal I での消化で約2.8kbの断片が切り出されるプラスミドDNA(pUC18gsk' #2)を選択した。本プラスミドDNAが有するgskはBglIIサイトで異種遺伝子が挿入されることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図2)。

次に、pUC18gsk' #2をSac I、Sph I およびDra I で消化し、gskとKm^r 遺伝子を含む約2.8Kbの断片を調製した。DraI消化の目的は、SacI-SphI断片の取得を容易にすることである。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(上述)のSac I サイトとSph I サイトとの間に挿入し、プラスミドpMAN997gsk' #2を得た。プラスミドpMAN997gsk' #2でFDR-18株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻) およびFADRadd-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地(3ml/試験管)に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(10⁻⁵~10⁻⁶程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレート、アンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートおよびカナマイシン20μg/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、アンピシリン25μg/mlを含むLB寒天プレートには生育しないがカナマイシン20μg/mlを含むLB寒天プレートには生育するクローンを選んだ。さらにこれらの目的クローンの染色体DNAからPCRによりgsk遺伝子を含む断片を増幅させ、本来の約1.5kb断片ではなくKm^r 遺伝子を含む約2.8kb断片が増幅されていることを確認した。またこれらのクローンでは、イノシンーグアノシン・キナーゼ活性が検出されないことを確認した。イノシンーグアノシン・キナーゼ活性は臼田ら(Biochim. Biophys. Acta., 1341, 200-206(1997))の方法に

従って行った。これらのクローンをgsk欠失株とし、FDR-18株 (purF^- , deoD^- , purR^-) およびFADRadd-8-3株 (purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^-)由来のものをそれぞれFDRG-18-13株およびFADRaddG-8-3株とした。

2) 脱感作型purFプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

1)で作製したFDRG-18-13株 (purF^- , deoD^- , purR^- , gsk^-) およびFADRaddG-8-3株 (purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- , gsk^-)にpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWを導入し、プリンヌクレオシド生産能を評価するにあたり、プラスミドpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWは薬剤選択マーカー遺伝子が Km^r 遺伝子であり、宿主FDRG-18-13株およびFADRaddG-8-3株もまたカナマイシン耐性となっているので、形質転換体を得るのが困難である。そこでプラスミドpKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWの薬剤選択マーカー遺伝子の交換をアンピシリン耐性遺伝子を持つpUC18ベクター (宝酒造社製)を用いて行った。pKF18とpUC18とはlacプロモーターとマルチクローニングサイトの位置関係が全く同じなので、pKFpurFKQおよびpKFpurFKQPWからPst I とHind IIIでpurFKQおよびpurFKQPW断片を切り出し、これらをpUC18のPst I サイトとHind IIIサイトの間に挿入し、pUCpurFKQおよびpUCpurFKQPWを作製した。これらで宿主FDRG-18-13株およびFADRaddG-8-3株を形質転換し、組換え体のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。 purA^- (アデニン要求性)の菌株についてはMS培地にアデニン 5mg/Lが添加されている。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表5に示す。この結果よりgsk欠失を付与した場合にはイノシンと共にグアノシンも蓄積することが認められた。

表 5
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | イノシン(mg/L) | グアノシン(mg/L) |
| W3110 | - | trace | 0 |
| FDRG-18-13 | pUCpurFKQ | 105 | 139 |
| FDRG-18-13 | pUCpurFKQPW | 108 | 93 |
| FADRaddG-8-3 | pUCpurFKQ | 126 | 52 |
| FADRaddG-8-3 | pUCpurFKQPW | 222 | 49 |

3)脱感作型purF染色体組込み株の作製とプリンヌクレオシド生産能評価

プラスミド pMAN997purFLKQ および pMAN997purFLKQPW でそれぞれ FDRG-18-3 株 (purF⁻, deoD⁻, purR⁻, gsk⁻) および FADRaddG-8-3 株 (purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻) を 30°C で形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン 25 μg/ml を含む LB 寒天プレートに塗布し、30°C で一晚培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン 25 μg/ml を含む LB 寒天プレートに塗布し、42°C で生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°C で生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個を LB 寒天プレートに塗布し、30°C で一晚培養した後に、LB 液体培地 (3ml/試験管) に接種し、42°C で 3~4 時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈 (10⁻⁵ ~ 10⁻⁶ 程度) し、LB 寒天プレートに塗布し、42°C で一晚培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に 100 コロニーをピックアップしてそれぞれを LB 寒天プレートとアンピシリン 25 μg/ml を含む LB 寒天プレートに生育させ、LB 寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から、FDRG-18-13 株 (purF⁻, deoD⁻, purR⁻, gsk⁻) の場合には最小培地に生育し、FADRaddG-8-3 株 (purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻) の場合には L-ヒスチジン 100mg/L および アデニン 50mg/L 添加最小培地に生

育するクローンを選択した。

さらにはこれらの目的クローンの染色体DNAを調製し、PCRによりpurFを含む約1.5kb断片を増幅させ、相同組換え置換による変異導入個所周辺の塩基配列を解析した結果、K326Q(326Lys→Gln)の変異、およびK326Q(326Lys→Gln)+P410W(410Pro→Trp)の変異をそれぞれが持つことが確認された。

FDRG-18-13株(purF⁻, deoD⁻, purR⁻, gsk⁻)由来のものをFDRG-18-13::KQ株(purFKQ, deoD⁻, purR⁻, gsk⁻)およびFDRG-18-13::KQPW株(purFKQPW, deoD⁻, purR⁻, gsk⁻)とし、FADRaddG-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻)由来のものをFADRaddG-8-3::KQ株(purFKQ, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻)およびFADRaddG-8-3::KQPW株(purFKQPW, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻)と命名した。

FADRaddG-8-3::KQ株(purFKQ, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻)には、プライベート・ナンバーAJ13334が付与された。同株は、1997年6月24日付けで通産省工業技術院生命工学工業技術研究所(郵便番号305-0046 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号)に、ブタベスト条約に基づいて国際寄託され、受託番号として、FERM BP-5993が付与された。

これらの4種の脱感作型purF染色体組込み株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。purA⁻(アデニン要求性)の菌株についてはMS培地にアデニン 5mg/Lが添加されている。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表6に示す。この結果よりgsk欠失を付与した場合にはイノシンと共にグアノシンも蓄積することが認められた。

表 6
プリンヌクレオシド生産能評価

| 菌株 | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|--------------------|-------------|-------------|
| | イノシン(mg/L) | グアノシン(mg/L) |
| W3110 | trace | 0 |
| FDRG-18-13::KQ | 150 | 140 |
| FDRG-18-13::KQPW | 145 | 125 |
| FADRaddG-8-3::KQ | 550 | 135 |
| FADRaddG-8-3::KQPW | 530 | 130 |

実施例 5

1) 野生型purR相同組換えプラスミドの作製とpurR⁺復帰染色体組込み株の作製

実施例 1 の4)でpUC19ベクター（宝酒造社製）のSal I サイトとSph I サイトの間に約1.8kbのpurR断片が搭載されているプラスミド(pUCpurR)を得た。このpUCpurRをSac I とSph I で消化し、野生型purRを含む約1.8Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997（上述）のSac I サイトとSph I サイトの間に挿入し、プラスミドpMAN997purRを得た。プラスミドpMAN997purRでFADRadd-8-3株（purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻）を30℃で形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した。次にこれらの培養菌体を、シングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 μg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42℃で生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42℃で生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した後に、LB液体培地（3ml/試験管）に接種し、42℃で3～4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈（10⁻⁵～10⁻⁶程度）し、LB寒天プレートに塗布し、42℃で一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップして、それぞれをLB

寒天プレートとアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から10クローンを無作為に選び、これらの染色体DNAからPCRによりpurR約1.8kb断片を増幅させ、PmaC Iで切断されるがBglIIIで切断されないクローンを選択した。これらのクローンをpurR⁺復帰株とし、FADadd-8-3-2株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, add⁻)とした。

2)脱感作型purFプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

1)で作製したFADadd-8-3-2株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, add⁻)にpKFpurFKQを導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。なお、FADRadd-8-3株についてもpKFpurKQによる形質転換体を作製し、purR欠失の効果を比較評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。MS培地にアデニン5mg/Lが添加されている。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表7に示す。FADadd (purR野生型) に比べ、FADRadd(purR⁻型)の方が優位なイノシンの生産を示し、purR欠失の効果が確認された。

表7
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|--------------|-----------|-------------|-------------|
| | | イノシン(mg/L) | グアノシン(mg/L) |
| W3110 | - | trace | 0 |
| FADRadd-8-3 | pKFpurFKQ | 1080 | 0 |
| FADadd-8-3-2 | pKFpurFKQ | 930 | 0 |

実施例6

1)イノシンーグアノシン・キナーゼ遺伝子(gsk)欠失株の再取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク (GenBank

Accession No.D00798) の情報に基づき、CTCGGTACCCTGTTGCGTTAAGCCATCCCAGA (配列番号16) とCTCGCATGCCAACGTACGGCATTAACCTA (配列番号17) の塩基配列を有する32merと29merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model9600(パナソニック社製)) を行い、ATGと翻訳終止コドンのカバーするgsk構造遺伝子領域 (約800bp) を含む約3.0kbの増幅断片をpUC19ベクター (宝酒造社製) のKpn I サイトとSph I サイトの間にクローン化した。PCR用プライマーにはKpn I サイトとSph I サイトがそれぞれデザインされている。

クローン化されたgsk断片の約3.0kbの5' 側から約900bpと1030bpの位置にAro51 HIサイトが2ヶ所、1640bpの位置にBgl II サイトがそれぞれ1ヶ所あるのでプラスミドをAro51HIとBgl II で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化した後、Aro51HI-Bgl II断片を除去して、T4 DNA リガーゼでベクター側のDNAのセルフライゲーションを行った。このライゲーション液でE.coli JM109のコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からAro51HIあるいはBgl II では切断されず、Kpn I とSph I での消化で約2.3kbの断片が切り出されるプラスミドDNA(pUC19gsk' #10)を選択した。本プラスミドDNAが有するgskはAro51HIサイトとBgl II サイトの間に構造遺伝子が欠失することになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される (図3)。

次に、pUC19gsk' #10をKpn I およびSph I で消化し、gsk遺伝子を含む約2.3Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997 (上述) のKpn I サイトとSph I サイトの間に挿入し、プラスミドpMAN997gsk' #10を得た。プラスミドpMAN997gsk' #10でFADRadd-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラ

スミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30℃で一晩培養した後に、LB液体培地（3ml／試験管）に接種し、42℃で3～4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈（ 10^{-5} ～ 10^{-6} 程度）し、LB寒天プレートに塗布し、42℃で一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップして、それぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。さらにアンピシリン感受性のクローンの中から10クローンを無作為に選び、これらの染色体DNAから先のPCRプライマーを用いてPCRによりgsk遺伝子を含む断片を増幅させ、本来の約3.0kb断片ではなく約2.3kb断片が増幅されているクローンを選択した。またこれらのクローンでは、イノシンーグアノシン・キナーゼ活性が検出されないことを確認した。イノシンーグアノシン・キナーゼ活性は臼田ら(Biochim. Biophys. Acta., 1341, 200-206(1997))の方法に従って行った。これらのクローンを新たなgsk欠失株とし、FADRadd-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)由来のものをFADRaddgsk株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻)とした。

2) GMPリダクターゼ遺伝子(guaC)欠失株の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク(E. coli Gene Bank)の情報に基づき、CTCAAGCTTACGGCTCTGGTCCACGCCAG(配列番号18)とCTCC TGCAGCAGCGTTGGGAGATTACAGG(配列番号19)の塩基配列を有する29merと29merの両端プライマーによるPCR法(94℃, 30sec; 55℃, 1min; 72℃, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model9600(パナソニック社製))を行い、SD-ATGと翻訳終止コドンのカバーするguaC構造遺伝子領域の約2.2kbの増幅断片をpUC18ベクター(宝酒造社製)のHindIIIサイトとPstIサイトの間にクローン化した。PCR用プライマーにはHindIIIサイトとPstIサイトがそれぞれデザインされている。

クローン化された2.2kbのguaC断片の5'側から約1.1kbの位置にBglIIサイトが1ヶ所あるので、BglIIで切断後、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化した後に、T4 DNAリガーゼで連結した。このライゲーション液でE. coli JM109のコンピテ

ント細胞を形質転換し、アンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。18クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からHindIIIとPstIで約2.2kbの断片が得られ、かつBglIIで本断片が切断されないプラスミドDNA(pUC18guaC' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するguaCはBglIIサイトでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図3)。

次に、pUC18guaC' #1をHindIIIとPstIで消化し、guaCを含む約2.2Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(上述)のHindIIIサイトとPstIサイトの間に挿入し、プラスミドpMAN997guaC' #1を得た。プラスミドpMAN997guaC' #1でFADRad-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)およびFADRaddgsk株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻)を30°Cで形質転換し、それぞれ得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地(3ml/試験管)に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(10^{-5} ~ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。これらのクローンの染色体DNAからPCRによりguaCを含む約2.2kb断片を増幅させ、BglIIで切断されないことを確認した。以上を満足するクローンをguaC欠失株とし、FADRadd-8-3およびFADRaddgsk由来のものをそれぞれFADRaddguaC株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, guaC⁻)およびFADRaddgskguaC株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻, guaC⁻)とした。またこれらのクローンでGMPリダクターゼ活性が検出されな

いことを確認した。GMPリダクターゼ活性の測定は、B.B.Garberら(J. Bacteriol., 43, 105(1980))の方法に従って行った。

3)脱感作型purFプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

2)で作製したFADRaddguaC株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, guaC⁻)およびFADRaddgskguaC株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, gsk⁻, guaC⁻)にpKFpurFKQを導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。MS培地(基本培地)にアデニンが5mg/L添加してある。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表8に示す。guaCを欠失することにより、若干のグアノシン増産効果が認められた。

表8
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|----------------|-----------|-------------|-------------|
| | | イノシン(mg/L) | グアノシン(mg/L) |
| FADRadd-8-3 | pKFpurFKQ | 1080 | 0 |
| FADRaddguaC | pKFpurFKQ | 670 | 20 |
| FADRaddgsk | pKFpurFKQ | 920 | 140 |
| FADRaddgskguaC | pKFpurFKQ | 750 | 180 |

実施例7

1)6-フオスフォグルコン酸デヒドラーゼ遺伝子(edd)欠失株の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク(E. coli Gene Bank)において「edd」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、CTCGAATTCGGATATCTGGAAGAAGAGGG(配列番号20)とCTCAAGCTTGGAATAGTCCCTTCGGTAGC(配列番号21)の塩基配列を有する29merと29merの両端プライマーによるPCR法(94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Mod el9600(パ-キシル社製))を行い、ATGと翻訳終止コドンのカバーするedd構造遺

伝子領域およびATGの5'上流域約810bpおよび翻訳終止コドンの下流域約360bpを含む約3.0kbの増幅断片をそのままpCRTMIIベクター（Invitrogen社製）にクローニングした。本ベクターにはPCR産物増幅断片をそのままクローニングすることができ、またクローニングサイトの両近傍に制限酵素サイトとしてEcoRIサイトが存在する。またPCR用プライマーにはBamHIサイトとHindIIIサイトがそれぞれデザインされている。クローン化されたedd断片の約3.0kbの5'側から約660bpと1900bpの位置にStuIサイトが2ヶ所あるのでプラスミドをStuIで消化した。約1.25kbのStuI断片を除去したベクター側のセルフライゲーションをT4 DNA リガーゼで行った。このライゲーション液でE.coli HB101のコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からStuIでは1.25kbの断片が切りだされないプラスミドDNA(pCRTMIIedd' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するeddはプロモーター領域を含むタンパク質コード領域が除去されており、酵素が生成しなくなると予測される（図3）。

次に、pCRTMIIedd' #1をEcoRIで消化し、eddの一部とその近傍を含む約1.75Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997（上述）のEcoRIサイトに挿入し、プラスミドpMAN997edd' #1を得た。プラスミドpMAN997edd' #1でFADRadd-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地（3ml/試験管）に接種し、42°Cで3～4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(10^{-5} ～ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそ

れそれをLB寒天プレートとアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。これらの目的クローンの染色体DNAから、先に示したPCRプライマーでPCRによりedd領域を増幅させ、増幅断片サイズが野生型の約3.0kbではなく、欠失型の約1.75kbであるクローンを選択した。これらのクローンをedd欠失株とし、FADRaddedd株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻)とした。

2) 脱感作型purFプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

1)で作製したFADRaddedd株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻)にpKFpurFKQを導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じである。MS培地にアデニン5mg/Lが添加されている。eddがコードする6-フオスフォグルコン酸デヒドラーゼはグルコン酸で誘導され、グルコン酸(gluconate)をエントナー・ドウドルフ(Entner-Doudoroff)経路でビルビン酸へと代謝する第1段階の酵素である。この酵素が欠失することにより、グルコン酸がペントースリン酸経路へのみ流入すると考えられるので、ここではMS培地中のC源としてグルコース以外にグルコン酸(48g/L添加)も使用し、評価した。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表9に示す。eddを欠失することにより、グルコン酸をC源とする時に顕著なイノシン生産増大効果が認められた。また、C源をグルコースとした場合にも効果が認められた。

表9
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | C源 | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|-------------|-----------|-------|-------------|-------------|
| | | | イノシン(mg/L) | グアノシン(mg/L) |
| FADRadd-8-3 | pKFpurFKQ | グルコース | 1080 | 0 |
| FADRaddedd | pKFpurFKQ | // | 1340 | 0 |
| FADRadd-8-3 | pKFpurFKQ | グルコン酸 | 1050 | 0 |
| FADRaddedd | pKFpurFKQ | // | 2600 | 0 |

実施例 8

1) フォスフォグルコース・イソメラーゼ遺伝子(pgi)欠失株の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク (E. coli Gene Bank) において「pgi」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、CTCGTCGACTCCATTTTCAGCCTTGGCAC (配列番号22) と CTCGCATGCGTCGCATCAGGCATCGGTTG (配列番号23) の塩基配列を有する29merと29merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model 9600 (パーキエルマ-社製)) を行い、ATGと翻訳終止コドンのカバーするpgi構造遺伝子領域を含む約2.2kbの増幅断片をpUC18ベクター (宝酒造社製) のSal I サイトとSph I サイトの間にクローン化した。PCR用プライマーにはSal I サイトとSph I サイトがそれぞれデザインされている。クローン化されたpgi断片の約2.2kbの5'側から約1170bpと1660bpの位置にBssHIIサイトとMluIサイトがそれぞれ1ヶ所あるのでプラスミドをBssHIIとMluIで消化した後、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端化した。BssHIIサイトとMluIサイトの間の約500bpの断片を除去したベクター側のセルフライゲーションをT4 DNA リガーゼで行った。このライゲーション液でE. coli JM109のコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン25 µg/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からSal IとSph Iでの処理で約1.7kbの断片が切りだされるプラスミドDNA(pUC18pgi' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するpgiはBssHIIサイトとMluIサイトの間で欠失が生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される (図3)。

次に、pUC18pgi' #1をSal IとSph Iで消化し、pgiを含む約1.7Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997 (上述) のSal IサイトとSph Iサイトの間に挿入し、プラスミドpMAN997pgi' #1を得た。プラスミドpMAN997pgi' #1でFADRaddd-8-3株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻)およびFADRaddedd(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻)を30°Cで形質転換し、それぞれ得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 µg/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングル

コロニーが得られるようにアンピシリン $25\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、 42°C で生育するコロニーを得た。さらにもう一度、 42°C で生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、 30°C で一晩培養した後に、LB液体培地（ $3\text{ml}/\text{試験管}$ ）に接種し、 42°C で3～4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈（ $10^{-5}\sim 10^{-6}$ 程度）し、LB寒天プレートに塗布し、 42°C で一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン $25\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。これらの目的クローンの染色体DNAから先に示したPCRプライマーでPCRによりpgi領域を増幅させ、増幅断片サイズが野生型の約 2.2kb ではなく、欠失型の約 1.7kb であるクローンを選択した。これらのクローンをpgi欠失株とし、FADRadd-8-3およびFADRaddedd由来のものをそれぞれFADRaddpgi株(purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- , pgi^-)およびFADRaddeddpgi株(purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- , edd^- , pgi^-)とした。

2) 脱感作型purFプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

1) で作製したFADRaddpgi株(purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- , pgi^-)およびFADRaddeddpgi株(purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- , edd^- , pgi^-)にpKFpurFKQを導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じであるが、生産評価用に使用した培地はMS培地（基本培地）中のイーストエキストラクトを0.8%に増量している。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表10に示す。pgiを欠失することにより、これまでのMS培地にアデニンを 5mg/L 添加した培地では生育が極度に悪くなったので、イーストエキストラクトを0.8%に増量した培地を用いたが、pgi⁺の親株では本培地では生育速度の増進とイノシン生産の低下および著量のヒポキサンチンの副生が見られた。一方、pgi欠失株では顕著なイノシン生産増大効果が

認められた。

表 10
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|---------------|-----------|-------------|---------------|
| | | イノシン(mg/L) | ヒポキサンチン(mg/L) |
| FADRadd-8-3 | pKFpurFKQ | 450 | 260 |
| FADRaddpgi | pKFpurFKQ | 2770 | 100 |
| FADRaddedd | pKFpurFKQ | 780 | 210 |
| FADRaddeddpgi | pKFpurFKQ | 3080 | 120 |

実施例 9

1) アデニン・デアミナーゼ遺伝子(yicP)欠失株の取得

遺伝子データバンク (E.coli Gene Bank) において、Bacillus subtilis由来のアデニン・デアミナーゼと相同性の高いORF(open reading frame, 構造遺伝子)として、yicPが登録されている。そこで、W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、「yicP」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、CTCCTGCAGC GACGTTTTCTTTTATGACA (配列番号24) とCTCAAGCTTCGTAAGTGGTGACTTTTGCC (配列番号25) の塩基配列を有する29merと29merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30 sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model9600(パナソニック社製)) を行い、ATGと翻訳終止コドンのカバーするyicP構造遺伝子領域およびATGの5' 上流域約50bpおよび翻訳終止コドンの下流域約40bpを含む約1.9kb断片を増幅した。PCR用プライマーにはPst I サイトとHind III サイトがそれぞれデザインされている。このPCR産物をPst I とHind III で切断後、pUC18ベクター (宝酒造社製) のPst I サイトとHind III サイトの間にクローン化した。クローン化されたyicP断片の約1.9kbの5' 側から約540bpと約590bpの位置にHap I サイトとEcoR V サイトがそれぞれ1ヶ所あるのでプラスミドをHap I とEcoR V で消化した後、Hap I -EcoR V の47bpを除去したDNAのセルフライゲーションをT4 DNA リガーゼで行った。このライゲーション液でE.coli JM109のコンピテント細胞を形質転換し、アンピ

シリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からHapIあるいはEcoRV消化で切断されないプラスミドDNA(pUC18yicP' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するyicPはHapI-EcoRVサイトの47bpを欠失させることでフレームシフトが生じることになり、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図3)。

次に、pUC18yicP' #1をPstIとHindIIIで消化し、yicP構造遺伝子を含む約1.9Kbの断片を調製した。この断片を温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(上述)のPstIサイトとHindIIIサイトの間に挿入し、プラスミドpMAN997yicP' #1を得た。プラスミドpMAN997yicP' #1でFAD⁻ Raddedd(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地(3ml/試験管)に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(10^{-5} ~ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。これらの目的クローンの染色体DNAから先に示したPCRプライマーでPCRによりyicP領域を増幅させ、増幅断片サイズがHapIあるいはEcoRVで切断されないクローンを選択した。またこれらのクローンではアデニン・デアミナーゼ活性が検出されないことを確認した。アデニン・デアミナーゼ活性はPer Nygaardら(J. Bacteriol., 178, 846-853(1996))の方法に従って行った。これらのクローンをyicP欠失株とし、FAD⁻ RaddeddyicP株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻)とした。

2) アデニン・デアミナーゼ遺伝子(yicP)欠失株よりフォスfogルコース・イソメラーゼ遺伝子(pgi)欠失株の取得

さらにFADRaddeddyicP株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻)にpgi欠失を付与した。実施例8で作製したpMAN997pgi' #1を用いて、実施例8に示したと同様の方法で、FADRaddeddyicPpgi株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻, pgi⁻)を得た。

3) 脱感作型purFプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

1)および2)で作製したFADRaddeddyicP株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻)およびFADRaddeddyicPpgi株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻, pgi⁻)にpKFpurFKQを導入した形質転換体を作製し、これらの株の生育におけるアデニン量に対するリスponsならびにプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じであるが、MS培地にアデニンを0~50mg/Lの範囲で添加した培地を使用した。

アデニンに対する生育リスponsおよびプリンヌクレオシド生産能の評価結果を表11に示す。yicPを欠失することにより、アデニン量に対する生育度が改善されるとともに、アデニン50mg/Lおよび20mg/L添加区でイノシン生産におけるyicP欠失の効果が認められた。

表 1 1
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | 添加 アデニン (mg/L) | 生育度 (OD) | プリンヌクレオシド蓄積 イノシン (mg/L) | ヒポキサンチン (mg/L) |
|------------------|-----------|----------------------|-------------|-------------------------------|-------------------|
| FADRaddd | pKFpurFKQ | 0 | 2.2 | 870 | 0 |
| | | 50 | 3.2 | 650 | 0 |
| FADRaddddyicP | pKFpurFKQ | 0 | 2.4 | 870 | 0 |
| | | 50 | 6.8 | 1100 | 40 |
| FADRadddpgi | pKFpurFKQ | 5 | 2.2 | 1420 | 28 |
| | | 20 | 3.4 | 1760 | 48 |
| FADRaddddyicPpgi | pKFpurFKQ | 5 | 2.1 | 1380 | 7 |
| | | 20 | 3.7 | 2350 | 19 |

実施例 1 0

1) P R P P シンセターゼ遺伝子(prs)の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク (E. coli Gene Bank) の情報に基づき、CTCGTCGACTGCCTAAGGATCTTCTCATGCCTGATATG (配列番号26) と CTCGCATGCGCCGGGTTCGATTAGTGTTTC (配列番号27) の塩基配列を有する38mer と29merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30 サイクル; Gene Amp PCR System Model9600(パナソニック社製)) を行い、SD-ATGと翻訳終止コドンのカバーするprs構造遺伝子領域の約1Kbの増幅断片をpUC18ベクター (宝酒造社製) にクローン化した。PCR用プライマーにはSal I サイトとSphI サイトがそれぞれデザインされている。このPCR産物をSal I とSphI で切断後、pUC18ベクターのSal I サイトとSphI サイトの間にクローン化した(pUCprs)。

2) 脱感作型prsの作製

1) でクローン化した約1kbのprsを搭載したプラスミドpUCprsよりSal I とSphI での消化によりprs断片を切り出し、変異導入用プラスミドpKF19k (宝酒造社製) のマルチクローニングサイトのSal I サイトとSphI サイトの間に挿入し直し、目的のクローンを得た(pKFprs)。S.G.Bowerら(J.Biol.Chem., 264, 10287(1989))

により、P R P Pシンセターゼ(Prs)はAMPやADPによりフィードバック阻害を受けることが示唆されている。またその128位のAsp(D)をAla(A)に変異したものが部分的脱感作されていると述べている。そこで、P R P Pシンセターゼ(Prs)の128位のAsp(D)をAla(A)に変異できるような遺伝子置換を行うために以下の合成DNAプライマーを作製し、Site-directed Mutagenesis System Mutan-Super Express Km (宝酒造社製)のプロトコールに従って、pKFprsに部位特異的変異を導入した。

D128A変異用プライマー : 5'-GCGTGCAGAGCCACTATCAGC-3' (配列番号28)

変異導入操作後、得られた形質転換体の12クローンを無作為にピックアップし、プラスミドを調製し、変異導入個所周辺の塩基配列を解析した結果、目的のものが9クローン得られたことが確認された。この変異型prsを持つpKFprsDAからSal IとSph Iでprs断片を切り出し、pUC18とpSTV18 (宝酒造社製)のSal IサイトとSph Iサイトの間に乗せ換えた。また野生型prsをコントロールとして用いるために、先に作製したpUCprsからSal IとSph Iでprs断片を切り出し、pSTV18 (宝酒造社製)のSal IサイトとSph Iサイトの間に乗せ換えた。これらのpUCprsDAとpSTVprsDAおよびpUCprsとpSTVprsはそれぞれpUC18およびpSTV18由来のlacp/o (ラクトースオペロンのプロモーター)の下流に変異型および野生型のprsが挿入されており、本プロモーターの支配下にprsが発現する。

以上の4つのプラスミドでE.coli JM109を形質転換した組換え体をLB液体培地で8時間培養した後に菌体を集め、粗酵素抽出液を調製した。これらのP R P Pシンセターゼ活性およびADPによる阻害度の測定をK.F.Jensenら (Analytical Biochemistry, 98, 254-263(1979))の方法を一部改変して行った。すなわち基質として $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を使用し、反応で生成する $[\text{}^{32}\text{P}]\text{AMP}$ を測定した。その結果を表12に示した。

表 1 2
P R P P シンセターゼ(Prs)活性

| 宿主 | プラスミド | 性質 | 比活性(nmol/min/粗酵素液mg) | |
|-------|-----------|----------|----------------------|--------|
| | | | なし | 5mMADP |
| JM109 | pUC18 | コントロール | 2.9 | ND |
| JM109 | pUCprs | 高コピー、野生型 | 75.9 | ND |
| JM109 | pUCprsDA | 高コピー、変異型 | 80.8 | 20.2 |
| JM109 | pSTVprs | 中コピー、野生型 | 11.5 | ND |
| JM109 | pSTVprsDA | 中コピー、変異型 | 10.6 | 2.7 |

3)脱感作型prsプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

実施例 9 の3)で作製したFADRaddeddyicPpgi株(purF^- , purA^- , deoD^- , purR^- , add^- , edd^- , yicP^- , pgi^-)にpKFpurFKQを導入した形質転換体をさらにprsやprsDA遺伝子を搭載したpSTVprsとpSTVprsDAでそれぞれ形質転換し、2プラスミド共存型の菌株を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例 1 と同じであるが、MS培地中のイーストエキストラクト量を0.4%にした培地を使用した。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表 1 3 に示す。変異型prsDAをプラスミドとして導入することにより、イノシン生産増大効果が認められた。

表 1 3
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|-------------------|---------------------|----------------|-------------------|
| | | イノシン (mg/L) | ヒポキサンチン (mg/L) |
| FADRaddeddyicPpgi | pKFpurFKQ | 1600 | 8 |
| | pKFpurFKQ+pSTVprs | 1450 | 3 |
| | pKFpurFKQ+pSTVprsDA | 1815 | 10 |

実施例 1 1

1) キサントシン・フォスホリラーゼ遺伝子(xapA)欠失株の取得

遺伝子データバンク (E.coli Gene Bank) において「xapA」をキーワードにして検索される情報に基づいて作製された、4種類のプライマーによるCross-over PCR法により、一段階操作にて変異不活化遺伝子を構築した。使用したプライマーを以下に示す。

N-out: 5'-CGCGGATCCGCGACATAGCCGTTGTCGCC-3' (配列番号29)

N-in: 5'-CCCATCCACTAAACTTAAACATCGTGGCGTGAAATCAGG-3' (配列番号30)

C-in: 5'-TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCATCAACCTTATTTGTGG-3' (配列番号31)

C-out: 5'-CGCAAGCTTCAAACCTCCGGGTACGGGCG-3' (配列番号32)

まず、N-out(29mer)とN-in(39mer)およびC-in(39mer)とC-out(29mer)の両端プライマーにより、W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、それぞれPCR法 (94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model 9600 (パナソニック社製)) を行い、2つのPCR産物 (ともに約850bp断片) を得、次に2つのPCR産物を混合して、再度N-outとC-outを両端プライマーとしてPCRを行い、xapA構造遺伝子領域を含む遺伝子領域が約2.4kb断片 (野生型のサイズ) から約1.7kb断片に短縮した遺伝子断片を増幅した。またN-outとC-outのPCR用プライマーにはBamHIサイトとHindIIIサイトがそれぞれデザインされている。このPCR産物をBamHIとHindIIIで切断後、この断片と温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997 (上述) をBamHIとHindIIIで切断したプラスミドとのライゲーションをT4 DNA リガーゼで行った。このライゲーション液でE.coli JM109のコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン25 µg/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からBamHIとHindIIIでの消化で約1.7kbの切断断片が生じるプラスミドDNA(pMAN997xapA' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するxapAは構造遺伝子の約700bpが欠失することで、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される (図3)。

このプラスミドpMAN997xapA' #1でFADRaddeddyicPpgi株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻, pgi⁻)を30°Cで形質転換し、それぞれ得られたコロニーの

複数個をアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体をシングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地（3ml/試験管）に接種し、42°Cで3～4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈（ 10^{-5} ～ 10^{-6} 程度）し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 $\mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。これらの目的クローンの染色体DNAから先に示したN-outとC-outのPCRプライマーでPCRによりxapA領域を増幅させ、増幅断片サイズが約1.7 kbのクローンを選択した。これらのクローンをxapA欠失株とし、FADRaddeDyicPpgixapA株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻, pgi⁻, xapA⁻)とした。このxapA欠失株では、キサントシンの添加培養によって、培地中にキサントシンの生成が認められず、またキサントシン・フォスフォリラーゼが誘導されていないことも確認できた。キサントシン・フォスフォリラーゼ活性の測定はK. Hammer Jespersenら(Molec. Gen. Genet., 179, 341-348(1980))の方法に従って行った。

2) 脱感作型purFプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

1)で作製したFADRaddeDyicPpgixapA株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻, pgi⁻, xapA⁻)にpKFpurFKQを導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じであるが、MS培地中のイーストエキストラクトを0.8%に増量した培地を使用した。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表14に示す。MS培地中のイーストエキストラクトを増量した場合に、培養後半の糖消費後に顕著に生じるヒポキサン

チンの副生が、xapAを欠失することにより減少するとともに、イノシン生産増大効果が認められた。

表 1 4
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | 培養時間 (days) | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|-----------------------|-----------|----------------|----------------|-------------------|
| | | | イノシン (mg/L) | ヒポキサンチン (mg/L) |
| FADRaddeddyicPpgi | pKFpurFKQ | 3 | 4640 | 146 |
| | | 6 | 1850 | 1500 |
| FADRaddeddyicPpgixapA | pKFpurFKQ | 3 | 5870 | 57 |
| | | 6 | 3810 | 915 |

実施例 1 2

1)ヌクレオシドパーミアーゼ遺伝子(nupG)欠失株の取得

W3110株の染色体DNAを鋳型として用い、遺伝子データバンク (E. coli Gene Bank) の情報に基づき、CTCGAATTCATGGTGCCGAACACCTTGATAAACG (配列番号33) とCTCGTCGACATGCCGAAACCGGCGAATATAGCGAC (配列番号34) の塩基配列を有する35merと35merの両端プライマーによるPCR法 (94°C, 30sec; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30サイクル; Gene Amp PCR System Model9600(ハーフキンエルマー社製)) を行い、SD-ATGと翻訳終止コドンのカバーするnupG構造遺伝子領域の約2.7Kb断片を増幅した。PCR用プライマーにはEcoRIサイトとSalIサイトがそれぞれデザインされている。この増幅断片をEcoRI、SalIおよびAflIIIで処理した。AflIIIサイトはPCR増幅断片中に2ヶ所あり、約750bp、820bpおよび1130bpの3断片が生成する。その中でAflIII切断断片の約820bpを除く約720bpと1130bpの2断片を回収し、pUC18ベクター (宝酒造社製) をEcoRIおよびSalI切断したDNAとT4 DNA リガーゼでライゲーションした。このライゲーション液でE. coli HB101を形質転換し、出現したコロニーの16個よりプラスミドを調製し、EcoRIとSalIでの切断断片が約1.9kbのクローン(pUC18nupG' #1)を選択した。さらにpUC18nupG' #1をEcoRIとSalIで処理し、生

じる約1.9kbの断片と温度感受性複製起点(tsori)を有する相同組換え用ベクターであるpMAN997(上述)をEcoRIとSalIで切断したプラスミドとのライゲーションをT4 DNA リガーゼで行った。このライゲーション液でE.coli JM109のコンピテント細胞を形質転換し、アンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育する形質転換体を得た。10クローンの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、この中からEcoRIとSalIでの処理で約1.9kbの切断断片が生じるプラスミドDNA(pMAN997nupG' #1)を選択した。本プラスミドDNAが有するnupGは構造遺伝子の約820bpを欠失させることで、コードされる酵素は機能を持たなくなると予測される(図3)。

このプラスミドpMAN997nupG' #1でFADRaddeddyicPpgi株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻, pgi⁻)を30°Cで形質転換し、得られたコロニーの複数個をアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。次にこれらの培養菌体を、シングルコロニーが得られるようにアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに塗布し、42°Cで生育するコロニーを得た。さらにもう一度、42°Cで生育するシングルコロニーを得る操作を繰り返し、相同組換えによりプラスミド全体が染色体に組込まれたクローンを選択した。本クローンがプラスミドを細胞質液中に持たないことを確認した。次にこのクローンの複数個をLB寒天プレートに塗布し、30°Cで一晩培養した後に、LB液体培地(3ml/試験管)に接種し、42°Cで3~4時間、振とう培養した。これをシングルコロニーが得られるように適当に希釈(10^{-5} ~ 10^{-6} 程度)し、LB寒天プレートに塗布し、42°Cで一晩培養し、コロニーを得た。出現したコロニーの中から無作為に100コロニーをピックアップしてそれぞれをLB寒天プレートとアンピシリン25 μ g/mlを含むLB寒天プレートに生育させ、LB寒天プレートにのみ生育するアンピシリン感受性のクローンを選んだ。これらの目的クローンの染色体DNAから先に示したPCRプライマーでPCRによりnupG領域を増幅させ、増幅断片サイズが約1.9kbのクローンを選択した。これらのクローンをnupG欠失株とし、それぞれFADRaddeddyicPpginupG株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻, yicP⁻, pgi⁻, nupG⁻)とした。

2) 脱感作型purFプラスミド導入株のプリンヌクレオシド生産能評価

1)で作製したFADRaddeddyicPpginupG株(purF⁻, purA⁻, deoD⁻, purR⁻, add⁻, edd⁻,

yicP⁻, pgi⁻, nupG⁻)にpKFpurFKQを導入した形質転換体を作製し、これらの株のプリンヌクレオシド生産能を評価した。プリンヌクレオシド生産用の基本培地および培養方法ならびに分析方法は実施例1と同じであるが、MS培地中のイーストエキストラクトを1.2%に増量した培地を使用した。

プリンヌクレオシド生産能の評価結果を表15に示す。MS培地中のイーストエキストラクトを増量した場合に、nupGの欠失により、培養後半の糖消費後に顕著に生じるヒポキサンチンの副生が減少するとともに、イノシン生産増大効果が認められた。

表 1 5
プリンヌクレオシド生産能評価

| 宿主 | プラスミド | プリンヌクレオシド蓄積 | |
|-----------------------|-----------|----------------|-------------------|
| | | イノシン (mg/L) | ヒポキサンチン (mg/L) |
| FADRaddeddyicPpgi | pKFpurFKQ | 1190 | 835 |
| FADRaddeddyicPpginupG | pKFpurFKQ | 3390 | 315 |

産業上の利用可能性

本発明によれば、プリンヌクレオシド生合成系で制御を受ける酵素を脱抑制および脱感作し、さらには分解系や転換系をブロックすることにより、プリンヌクレオシド生産菌が創製される。創製されたプリンヌクレオシド生産菌は、プリンヌクレオシドを発酵法により生産するために好適に使用できる。

請求の範囲

1. エシェリヒア属に属し、プリンヌクレオシド生産能を有する微生物。
2. プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の細胞内での活性が上昇することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した請求項 1 記載の微生物。
3. プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の遺伝子の発現量が上昇することによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した請求項 1 記載の微生物。
4. プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節が解除されることによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した請求項 1 記載の微生物。
5. フィードバック阻害が解除されることによりプリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節が解除される請求項 4 記載の微生物。
6. プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素が、ホスホリボシルピロリン酸アミドトランスフェラーゼである請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載の微生物。
7. プリンヌクレオシド生合成に関与する酵素が、ホスホリボシルピロリン酸シンセターゼである請求項 3 または 4 記載の微生物。
8. プリン・リプレッサーが不活化することによりプリンヌクレオシド生合成に関与する酵素の調節が解除される請求項 4 記載の微生物。
9. プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応が遮断されることによってプリンヌクレオシド生産能を獲得した請求項 1 記載の微生物。
10. プリンヌクレオシド生合成から分岐して他の代謝産物にいたる反応が、サクシニル-アデノシンモノリン酸シンターゼ、プリンヌクレオシド・フォスフォリラーゼ、アデノシン・デアミナーゼ、イノシン-グアノシン・キナーゼ、グアノシンモノリン酸リダクターゼ、6-フォスフォグルコン酸デヒドラーゼ、フォスフォグルコース・イソメラーゼ、アデニン・デアミナーゼ、キサントシン・フォスフォリラーゼから選ばれる酵素に触媒される反応である請求項 9 記載の微生物。
11. プリンヌクレオシドの細胞内への取り込みを弱化することによってプリンヌクレオシド生産能を強化した請求項 1 記載の微生物。
12. プリンヌクレオシドの細胞内への取り込みが、プリンヌクレオシドの細胞内への取り込みに関与する反応の遮断により弱化され、プリンヌクレオシドの細

胞内への取り込みに関与する反応がヌクレオシドパーミアーゼに触媒される反応である請求項 1 1 記載の微生物。

1 3. 請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の微生物を培地に培養し、プリンヌクレオシドを生成蓄積せしめ、プリンヌクレオシドを回収することを特徴とする発酵法によるプリンヌクレオシドの製造法。

1 / 3

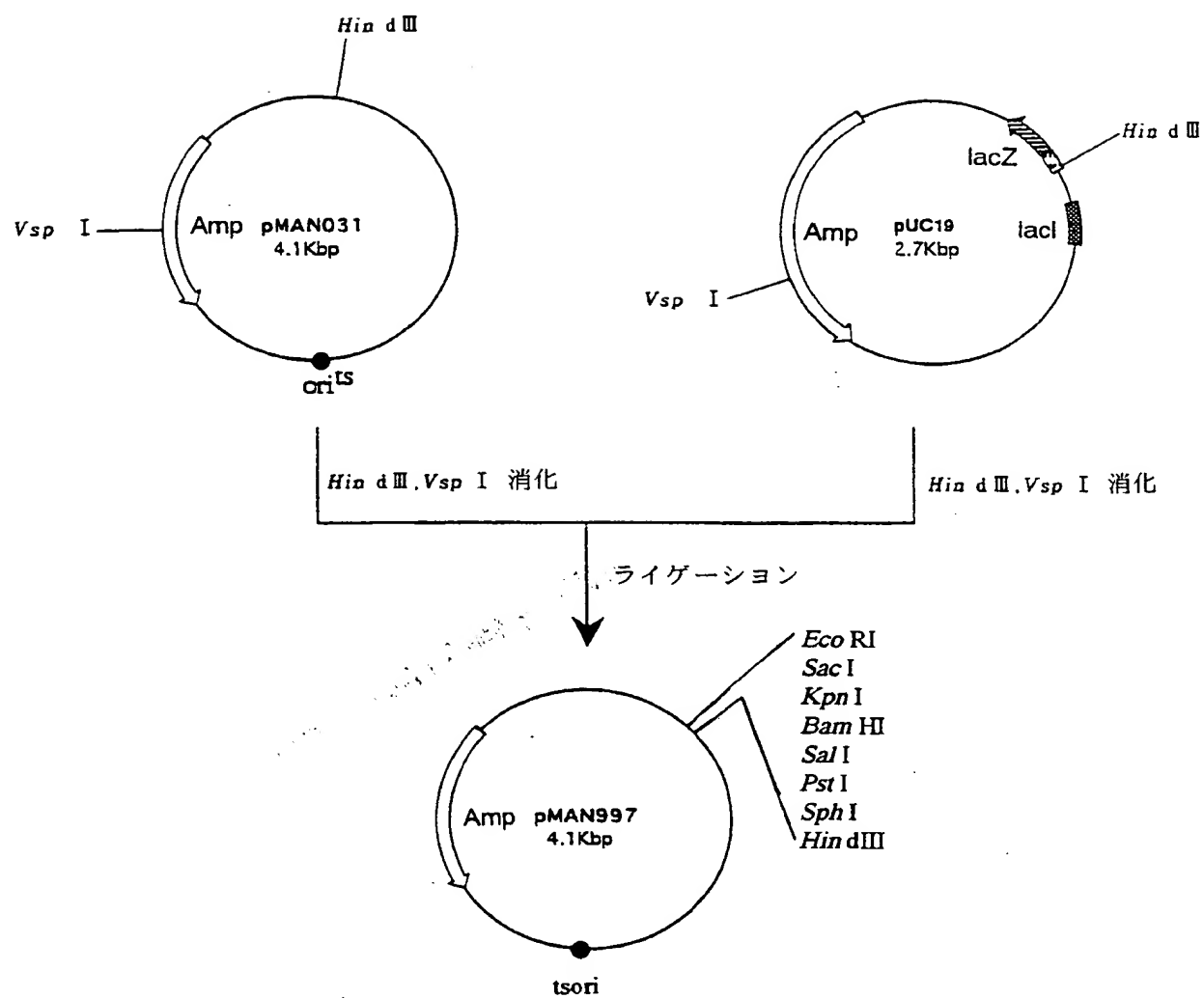


図 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 3

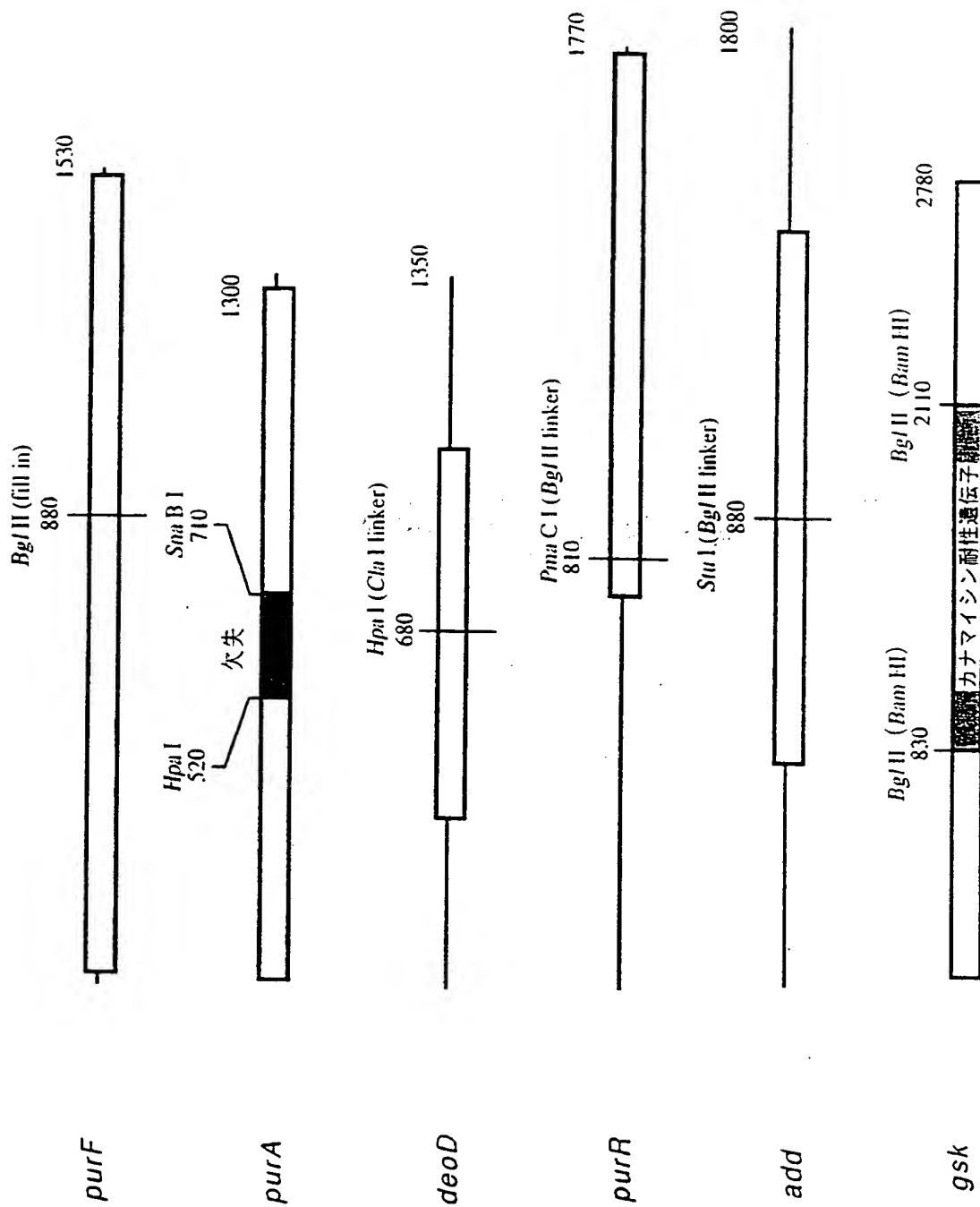
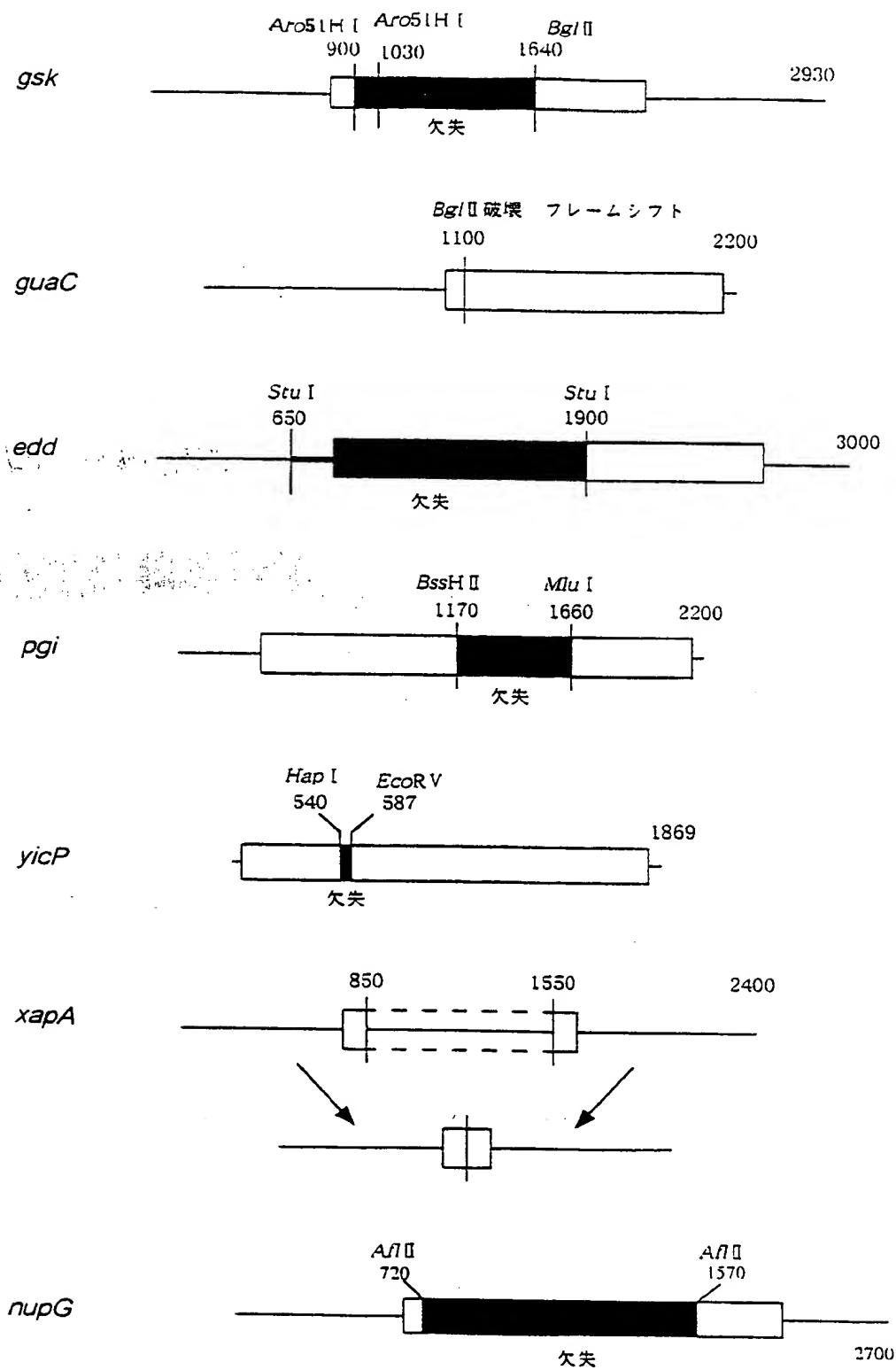


図 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/9

配列表

Sequence Listings

<110> 味の素株式会社(AJINOMOTO Co., Inc.)

<120> 発酵法によるプリンヌクレオシドの製造法

<130> B425SMOP759

<150> JP 9-194603

<151> 1997-07-18

<160> 34

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

ctcctgcaga acgaggaaaa agacgtatg

29

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

ctcaagcttt catccttcgt tatgcatttc g

31

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

ctcgagctca tgggtaacaa cgtcgtcgta c

31

<210> 4

<211> 31

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ctcgtcgact tacgcgtcga acgggtcgcg c

31

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

ctcgtcgacg cgggtctgga actgttcgac

30

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

ctcgcacgcc cgtgctttac caaagcgaat c

31

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

ctcgtcgacg aaagtagaag cgtcatcag

29

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/9

<223> Synthetic DNA

<400> 8

ctcgcatgct taacgacgat agtcgcgg

28

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

gggcttcgtt cagaaccgct atgttgg

27

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

tatggtattg atatgtggag cgccacggaa c

31

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

ctcgtcgacg gctggatgcc ttacgcac

29

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/9

ctcgcatgca gtcagcacgg tatatcgtg 29

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

ctcaagcttg tctgatttat cacatcatc 29

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

ctcgagctca tgaaatttcc cgg 23

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

ctcggatccg gtaccatgct g 21

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

ctcggtaccc tgttgcgtta agccatccca ga 32

<210> 17

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 17
ctcgc atgcc aacgtacggc attaaccta

29

<210> 18
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 18
ctcaagctta cggctctggt ccacgccag

29

<210> 19
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 19
ctcctgcagc agcgttggga gattacagg

29

<210> 20
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 20
ctcgaattcg gatattctgga agaagaggg

29

<210> 21
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/9

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

ctcaagcttg gaatagtccc ttcggtagc

29

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

ctcgctgact ccattttcag ccttggcac

29

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

ctcgcatgcg tcgcatcagg catcggttg

29

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

ctcctgcage gacgttttct tttatgaca

29

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/9

<400> 25
ctcaagcttc gtaactggtg acttttgcc 29

<210> 26
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 26
ctcgtcgact gcctaaggat cttctcatgc ctgatatg 38

<210> 27
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 27
ctcgcacgac ccgggttcga ttagtggtc 29

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 28
gcgtgcagag ccactatcag c 21

<210> 29
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 29
cgcgatccg cgacatagcc gttgtcgcc 29

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 30
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 30
cccatccact aaacttaaac atcgtggcgt gaaatcagg 39

<210> 31
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 31
tgtttaagtt tagtgatgg gcatcaacct tatttgtgg 39

<210> 32
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 32
cgcaagcttc aaactccggg ttacgggcg 29

<210> 33
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 33
ctcgaattca tgggtccgaa ccaccttgat aaacg 35

<210> 34
<211> 35
<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/9

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

ctcgtegaca tgccgaaacc ggcgaatata gcgac

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

28 January 1999 (28.01.99)

International application No.:

PCT/JP98/03239

Applicant's or agent's file reference:

B425SMOP759

International filing date:

17 July 1998 (17.07.98)

Priority date:

18 July 1997 (18.07.97)

Applicant:

MATSUI, Hiroshi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

25 December 1998 (25.12.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu
 Yokoyama Building
 6th floor
 4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
 Chuo-ku
 Tokyo 103-0004
 JAPON

| | |
|--|---|
| Date of mailing (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00) | |
| Applicant's or agent's file reference B425SMOP759 | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No. PCT/JP98/03239 | International filing date (day/month/year) 17 July 1998 (17.07.98) |
| Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al | |

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP, BR, CN, US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

ID, JP, KR

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

| | |
|--|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Authorized officer Luis Hernandez Telephone No. (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

THIS PAGE BLANK (USPTO)

47
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference B425SMOP759 | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP98/03239 | International filing date (day/month/year) 17 July 1998 (17.07.1998) | Priority date (day/month/year) 18 July 1997 (18.07.1997) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/09, 1/21, C12P 19/32 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 19/32, C12R 1:19) | | |
| Applicant AJINOMOTO CO., INC. | | |

| | |
|---|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p> | |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> | |

| | |
|---|--|
| Date of submission of the demand 25 December 1998 (25.12.1998) | Date of completion of this report 03 August 1999 (03.08.1999) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No. | Authorized officer Telephone No. (81-3) 3581 1101 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/03239

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (UBPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 98/03239

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-13 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 1-13 | YES |
| | Claims | | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-13 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

The inventions disclosed in Claims 1-13 are not described in the documents cited in the international search report or in other documents deemed relevant to said inventions, and could not be invented easily by a person skilled in the art by combining statements in these documents.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

| | |
|--|--|
| EC number | 5.3.1.9 (BRENDA copyright notice) |
| Original Organism | E. coli (K10 <12>; phosphoglucose isomerase-like activity associated with the carboxy-terminal domains of glucosamine-6-phosphate synthase <33>) <2,12,33> |
| Systematic name | D-Glucose-6-phosphate ketol-isomerase |
| Recommended name | Glucose-6-phosphate isomerase |
| Synonyms | <ul style="list-style-type: none"> ⌚ Hexose 6-phosphate isomerase ⌚ PGI <12> ⌚ 6-Phosphoglucose isomerase ⌚ Phosphosaccharomutase ⌚ Phosphohexose isomerase ⌚ Phosphohexomutase ⌚ Phosphoglucoisomerase ⌚ Phosphohexoisomerase ⌚ Phosphoglucose isomerase ⌚ D-Glucose-6-phosphate isomerase ⌚ Isomerase, glucose phosphate ⌚ Hexose phosphate isomerase ⌚ Hexose monophosphate isomerase ⌚ Hexose isomerase ⌚ Glucose phosphoisomerase ⌚ Glucose 6-phosphate isomerase ⌚ Glucose phosphate isomerase ⌚ Oxoisomerase ⌚ Hexosephosphate isomerase |
| CAS registration number | 9001-41-6 |
| Reaction | D-Glucose 6-phosphate = D-fructose 6-phosphate |
| Reaction type | <ul style="list-style-type: none"> ⌚ Intramolecular oxidoreduction ⌚ Isomerization |
| Substrates/products | <ul style="list-style-type: none"> ⌚ S: Fructose 6-phosphate <2,33> ⌚ P: Glucose 6-phosphate <2,33> |
| Natural substrates | More (the formation of phosphoglucose isomerase is under respiratory control, during anaerobiosis the enzyme is derepressed parallely with other glycolytic enzymes <12>) <12> |
| Specific activity (micromol/min/mg) | -999 <12> |
| Km-value (mM) | <ul style="list-style-type: none"> ⌚ 0.2 {fructose 6-phosphate} (enzyme forms PGI I and PGI II <12>) <12> ⌚ 0.2 (enzyme forms PGI I and PGI II <12>) <12> |
| Inhibitors | 6-Phosphogluconate <2,12> |
| Purification | |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

| | |
|-------------------------|---|
| | (2 forms: low-molecular weight form PGI I, and high-molecular weight form PGI II <12>) <2,12> |
| Molecular Weight | <ul style="list-style-type: none"> ● 220000-234000 (high-molecular weight form PGI II, gel filtration) <12> ● 120000-130000 (low-molecular weight form PGI I, gel filtration, sucrose density gradient centrifugation) <12> |
| Subunits | <ul style="list-style-type: none"> ● Dimer (2 * 59000, low-molecular weight form, SDS-PAGE <12>) <2,12> ● Tetramer (possible 4 * 59000, high-molecular weight form, SDS-PAGE <12>) <12> |
| References | <p><2> Noltmann, E.A.: Aldose-ketose isomerases:: The Enzymes, 3rd. Ed. (Boyer, P.D., ed.), 6; 271-354 (1972) (c,review)</p> <p><12> Schreyer, R.; Böck, A.: Phosphoglucose isomerase from Escherichia coli K10: purification, properties and formation under aerobic and anaerobic conditions:: Arch. Microbiol., 127; 289-298 (1980) (c)</p> <p><33> Leriche, C.; Badet-Denisot, M.-A.; Badet, B.: Characterization of a phosphoglucose isomerase-like activity associated with the carboxy-terminal domain of Escherichia coli glucosamine-6-phosphate synthase:: J. Am. Chem. Soc., 118; 1797-1798 (1996) (c)</p> |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類 (IPC) Int. Cl⁵ C12P19/32, C12N15/54, 15/70, 1/21 (C12P19/32, C12R1:19) (C12N15/54, C12R1:425) (C12N1/21, C12R1:19) (C12P19/32, C12R1:13, 1:19)

II. 国際調査を行った分野

調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料

分 類 体 系

分 類 記 号

IPC

C12P19/32, C12N15/54, 15/70, 1/21

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

Biological Abstracts Data Base (BIOSIS)

Chemical Abstracts Data Base (CA. REGISTRY)

III. 関連する技術に関する文献

| 引用文献の カテゴリー※ | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|----------|
| Y | JP, B1, 48-39477 (協和醸酵工業株式会社), 24. 11月. 1973 (24. 11. 73), &FR, A1, 1480009 &GB, A, 1139097 | 1. 6 |
| Y | JP, B1, 44-24309 (協和醸酵工業株式会社), 15. 10月. 1969 (15. 10. 69) | 1. 6 |
| Y | JP, B1, 41-16560 (協和醸酵工業株式会社), 19. 9月. 1966 (19. 09. 66) | 1. 6 |
| Y | JP, B1, 45-11556 (協和醸酵工業株式会社), 25. 4月. 1970 (25. 04. 70), &FR, A1, 1473629 &US, A, 3674641 &GB, A, 1092597 &DE, A1, 1517820 | 1. 6 |

※引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリーの文献

IV. 認 証

| | |
|---------------------------|-----------------------------|
| 国際調査を完了した日 14. 02. 90 | 国際調査報告の発送日 26. 02. 90 |
| 国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP) | 権限のある職員 特許庁審査官 内 田 俊 生 ㊞ |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

E P



P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔PCT 18条、PCT規則43、44〕

| | | |
|---|---|--------------------------------|
| 出願人又は代理人 書類記号 B 4 2 5 S M O P 7 5 9 | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/J P 9 8 / 0 3 2 3 9 | 国際出願日 (日.月.年) 1 7 . 0 7 . 9 8 | 優先日 (日.月.年) 1 8 . 0 7 . 9 7 |
| 出願人 (氏名又は名称) 味の素株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 2 図とする、☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/09, C12N1/21, C12P19/32, // (C12N1/21, C12R1:19), (C12P19/32, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/09, C12N1/21, C12P19/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
Genebank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | W0, 90/05784, A (協和醗酵株式会社) 31. 5月. 1990 (31. 05. 90) & JP, 2500062, A & EP, 406436, A | 1-13 |
| A | JP, 63-230094, A (協和醗酵株式会社) 26. 9月. 1988 (26. 09. 88) & EP, 282989, A & DE, 3884644, G | 1-13 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 10. 98

国際調査報告の発送日

27.10.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3449



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/09, C12N1/21, C12P19/32 // (C12N1/21, C12R1:19),
(C12P19/32, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/09, C12N1/21, C12P19/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | WO, 90/05784, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 31 May, 1990 (31. 05. 90) & JP, 2500062, A & EP, 406436, A | 1-13 |
| A | JP, 63-230094, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 26 September, 1988 (26. 09. 88) & EP, 282989, A & DE, 3884644, G | 1-13 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
9 October, 1998 (09. 10. 98)Date of mailing of the international search report
27 October, 1998 (27. 10. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)